

بررسی اثر کنترل چند اسانس گیاهی بر بیماری بلایت باکتریایی گندم در شرایط گلخانه

بهرخ شعبانی^۱، رسول رضائی^{۲*}، حبیب‌اله چاره‌گانی^۳ و امین صالحی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، پست الکترونیک: rrezaei@yu.ac.ir

۳- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۴- دانشیار، زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۷

چکیده

بیماری بلایت باکتریایی گندم توسط باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) ایجاد می‌شود و یکی از بیماری‌های مهم گندم در سراسر دنیا به‌شمار می‌آید. گسترش مقاومت بیماری‌ها به ترکیب‌های شیمیایی، نیاز به تحقیق برای کشف عوامل ضد میکروبی را سبب شده است. مطالعات نشان داده است که اسانس‌های گیاهی فعالیت بیولوژیک بر علیه باکتری‌های بیمارگر گیاهی القاء می‌کنند و می‌توانند به‌عنوان محصولات سالم مورد استفاده قرار گیرند. این ترکیب‌ها کمترین ضرر را برای اکوسیستم دارند و می‌توان از آنها به‌عنوان جایگزین ترکیب‌های سمی برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده نمود. این مطالعه در جهت ارزیابی فعالیت ضد بیماری اسانس‌های بدست آمده از قسمت‌های هوایی گیاهان رزماری، پونه و آویشن دنايي بر علیه باکتری PSS روی ارقام پیشتاز، سیروان و چمران گندم در شرایط گلخانه طراحی گردید. در این بررسی مشخص شد که تمام تیمارهای اسانس به‌طور معنی‌داری شدت بیماری بلایت باکتریایی گندم به ویژه روی رقم پیشتاز، و درصد ناحیه نکروز برگها ۳۰ روز پس از مایه‌زنی باکتری را کاهش دادند. بیشترین کاهش شدت بیماری توسط اسانس‌های پونه و آویشن دنايي بدست آمد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که اسانس‌های رزماری، پونه و آویشن دنايي قابلیت استفاده به‌عنوان عوامل ضد میکروبی را دارند.

واژه‌های کلیدی: بلایت باکتریایی، اسانس، کنترل، گندم.

مقدمه

استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی در کشاورزی موجب بروز مشکلات زیادی برای محیط‌زیست مانند آلودگی آب، خاک، حیوانات، مواد غذایی، مسمومیت کشاورزان، حذف ارگانیزم‌های غیرهدف و انتخاب بیمارگر گیاهی شده است. علاوه بر این در برخی از موارد بروز مقاومت در برابر این ترکیب‌ها، سبب می‌شود که اساساً کارایی خود را از دست

بدهند (Stangarlin *et al.*, 2011). به‌منظور به حداقل رساندن اثرهای منفی این سموم، استفاده از روش‌های کنترلی جایگزین شامل کنترل بیولوژیکی و استفاده از محصولات طبیعی به روش القای مقاومت، در حال توسعه می‌باشند. ایران از لحاظ آب و هوا، موقعیت جغرافیایی و زمینه رشد گیاهان دارویی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می‌گردد و در گذشته هم منبع تولید و مصرف

براساس دامنه میزبانی و بیماری زایی متمایز می‌شوند (Bultreys & Kaluzna, 2010). یکی از پاتووارهای این گونه *Pss* است که موجب آلودگی در ۱۸۰ گونه گیاهی می‌شود. بیماری سوختگی باکتریایی برگ یکی از بیماری‌های مهم گندم بوده که در مواردی سبب خسارت شدید شده است. این باکتری می‌تواند به صورت رورست روی بذر گندم زندگی کند (Kennelly *et al.*, 2007). این باکتری علاوه بر بیماری زا بودن، می‌تواند به عنوان هسته یخ عمل کند و در مناطق سردسیر باعث سرمازدگی و خسارت زیاد شود. در اثر این بیماری روی برگ‌های بالایی گیاه قبل از بلوغ و ظهور سنبله‌ها، لکه‌های آب‌سوخته، خاکستری و سبزرنگ به قطر یک میلی‌متر بروز می‌کنند. این لکه‌ها گسترش می‌یابند و خشک و سفیدرنگ می‌شوند. این لکه‌ها در طی چند روز به شکل خطوط نامنظم رنگ پریده در می‌آیند و سرانجام تمام برگ‌ها خشک می‌شوند. در هوای مرطوب، قطرات حاوی باکتری بر روی زخم‌ها پدید می‌آیند (Niknejad *et al.*, 2010). این بیماری نخستین بار در ایران در سال ۱۳۶۰ در استان کرمان مشاهده شد (Rahimian, 1989). تاکنون از مزارع گندم استان‌های کهگیلویه و بویراحمد، فارس، سیستان و بلوچستان و گیلان نیز گزارش شده است (Taghavi & Keshavarz, 2003). بیماری سوختگی برگ گندم از کشورهای مختلفی از جمله آمریکا، کانادا، آرژانتین و آفریقای جنوبی گزارش شده است (Niknejad *et al.*, 2010). کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی روشی جذاب برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی به‌شمار می‌آید. کاربرد اسانس‌های گیاهان دارویی علاوه بر توانایی کنترل بیماری‌های گیاهی، باعث کاهش هزینه‌ها شده و از تخریب تعادل اکولوژیکی محیط زیست جلوگیری می‌کند. امروزه بسیاری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی توسط عصاره‌های گیاهی کنترل می‌گردد (Hasanzadeh, 2005; Kizil & Uyar, 2006). از این رو در این تحقیق سعی شده اثرهای ضدباکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی موجود در طبیعت ایران، از جمله آویشن دناپی، رزماری و پونه برای تعیین میزان کارایی آنها روی عامل

گیاهان دارویی بوده است. در این راستا استفاده از ترکیب‌های طبیعی گیاهان برای کنترل بیماری‌های گیاهی، مورد توجه پژوهشگران زیادی قرار گرفته است. محققان زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه اثرهای ضدباکتریایی، ضدقارچی و حشره‌کشی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی پرداخته‌اند (Joseph *et al.*; Badawy & Abdelgaleil, 2014). (al., 2008).

گیاهان همواره به عنوان یک منبع مهم از ترکیب‌های فعال زیستی مورد توجه بوده‌اند. تاکنون تنها حدود ۲۱٪ از گیاهان شناخته شده در جهان در این گونه آزمون‌های زیستی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. بیش از ده هزار متابولیت ثانویه طبیعی با وزن مولکولی پایین توسط گیاهان تولید می‌شود که مقدار و نوع این متابولیت‌ها به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاهان بستگی دارد (D'Amato *et al.*, 2018). این روش در مورد ترکیب‌های طبیعی که ممکن است منجر به کشف عوامل مؤثر در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی شود، از اهمیت بسیاری برخوردار است. از این رو بسیاری از کشورها با استفاده از فناوری جدید، تهیه و فرمولاسیون سموم غیرشیمیایی از جمله آفت‌کش‌های با پایه و منشأ گیاهی مبادرت به کنترل تلفیقی بیماری‌های مهم گیاهی نموده‌اند (Fu *et al.*, 2007). کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی روشی جذاب برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی به‌شمار می‌آید (Badawy & Abdelgaleil, 2014). کاربرد اسانس‌های گیاهان دارویی علاوه بر توانایی کنترل بیماری‌های گیاهی، باعث کاهش هزینه‌ها شده و از تخریب تعادل اکولوژیکی محیط زیست ممانعت می‌کند. گندم نان (*Triticum aestivum* Linn.) مهمترین گیاه زراعی دنیا است که غذای بیش از یک سوم مردم جهان را تشکیل می‌دهد. عملکرد گندم تحت تأثیر بیمارگرهای متعددی از جمله *Pseudomonas syringae* (van Hall 1902) pv. *syringae* (*Pss*) قرار می‌گیرد (Young *et al.*, 1978). گونه *P. syringae* یک باکتری گرم منفی از رده *Gammaproteobacteria*، خانواده *Pseudomonadaceae* و شامل بیش از ۵۰ پاتووار است که

شناسایی جدایه‌ها براساس آزمون‌های فنوتیپی

به منظور تشخیص جدایه‌های بدست آمده از میزبان‌های آلوده، آزمون‌های مختلفی بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی انجام شد (Schaad et al., 2001). این آزمون‌ها شامل اکسیداز، کاتالاز، گرم، بررسی رنگ پرگنه روی محیط کشت‌های NA، Yeast Extract، Dextrose Calcium Carbonate Agar (YDC) و تولید رنگ فلورسنت روی محیط KB، هیدرولیز ژلاتین، آرژینین دهیدرولاز، هیدرولیز آسکولین، له کردن ورقه‌های سیب‌زمینی، تولید لوان، واکنش فوق حساسیت روی برگ‌های توتون و رشد هوازی و بی‌هوازی بودند.

نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی که شامل گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، آویشن دنايي (*Thymus daenensis*) و پونه (*Mentha spicata*) می‌باشند (جدول ۱) از مراتع استان کهگیلویه و بویراحمد (بویراحمد و سی سخت) جمع‌آوری و توسط متخصصان گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه یاسوج مورد تأیید قرار گرفتند. نمونه‌ها در سایه و در شرایط آزمایشگاهی خشک شدند.

بیماری باکتریایی گندم، در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گیرد، تا بتوان در صورت امکان جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی تهیه نمود.

مواد و روش‌ها

باکتری مورد استفاده

در بازدیدهایی که از مزارع گندم در استان کهگیلویه و بویراحمد بعمل آمد، نمونه‌های برگ گیاهان دارای علائم بیماری، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. برگ‌های آلوده در ابتدا با آب چندین بار شسته شده و بعد توسط محلول ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ ثانیه ضد عفونی و در پایان با آب مقطر سترون شست و شو شد. بافت‌های آلوده به همراه مقداری آب سترون به طور کامل در هاون سترون خرد و بعد چند قطره از این عصاره روی محیط کشت (KB) Kings B medium و Nutrient Agar (NA) مخطط گردید. یک جدایه مرجه *Pss* به شماره IVIA774-1 اهدایی مؤسسه Insituto Valenciano de investigaciones Agrarias (IVIA) از اسپانیا برای مقایسه در آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- مشخصات گیاهان مورد استفاده در این تحقیق

نام علمی	نام فارسی	خانواده	اندام مورد استفاده
<i>Rosmarinus officinalis</i>	رزماری	Lamiaceae	گل و برگ
<i>Thymus daenensis</i>	آویشن دنايي	Lamiaceae	برگ و شاخه
<i>Mentha spicata</i>	پونه	Lamiaceae	برگ و شاخه

اسانس‌گیری از نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی به صورت تر تهیه و در سایه و شرایط آزمایشگاهی خشک شدند. برای استخراج اسانس‌ها از روش تقطیر با آب به وسیله دستگاه تقطیر گردشی (کلونجر) استفاده شد. نمونه‌های گیاهی خشک شده توسط آسیاب

برقی خرد و به صورت پودر درآمدند، به گونه ای که هنگام مخلوط شدن با آب حالت خمیری به خود نگیرد. حدود ۵۰ گرم از اندام پودر شده هر گیاه در داخل بالن دستگاه کلونجر ریخته و نیمی از حجم بالن با آب مقطر پر گردید و پس از آن عمل تبخیر با گرمادهی انجام شد. اسانس‌گیری از

شدند. دینامیک جمعیت یک، سه، پنج، هفت و دوازده روز پس از مایه‌زنی به روش زیر اندازه‌گیری شد. در هر روز یک گرم از بافت برگ مایه‌زنی شده هر رقم گندم با آب معمولی شستشو و با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ ضدعفونی و بعد سه بار با آب مقطر سترون شستشو شدند، سپس برگ‌ها در هاون چینی سترون عصاره‌گیری شدند. از عصاره برگ سری رقت تهیه شد و از رقت‌های مختلف ۱۰۰ میکرولیتر در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت گذاشته و با لوله L شکل کشت انجام گردید و در دمای ۴۸ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ۴۸-۷۲ ساعت کلنی‌های رشد کرده شمارش گردید. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. محیط کشت Nutrien Broth Agar برای بررسی دینامیک جمعیت مورد استفاده قرار گرفت (Gross & De Vay, 1977).

آزمون بررسی شدت بیماری‌زایی

به منظور بررسی شدت بیماری‌زایی، ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی از برگ‌های ارقام مختلف گندم (سیروان، چمران، پیشتاز) که توسط اسانس‌های آویشن، رزماری و پونه مایه‌زنی شده بودند عکس برداری انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار Image J درصد ناحیه نکروز برگ محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های اولیه در نرم‌افزار Excel وارد و تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها براساس روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ انجام گردید.

نتایج

نمونه برداری و جداسازی

از برگ گیاهان دارای علائم بلایت، جدایه‌هایی با

زمان به جوش آمدن مایع درون بالن به مدت ۳ ساعت انجام شد، بخارهای تولید شده پس از عبور از لوله‌های سردکننده مایع و در ظرف گیرنده جمع‌آوری گردید. مایع حاصل، حاوی اسانس بوده و از آنجایی که اسانس به دلیل سبک‌تر بودن در سطح آن قرار می‌گیرد، به آسانی قادر به جداسازی می‌باشد. اسانس بدست‌آمده توسط سولفات سدیم آبگیری گردید و برای جلوگیری از اکسیداسیون، اسانس‌های بدست‌آمده در درون ظرف‌هایی کوچک با رنگ تیره ویژه اسانس در یخچال نگهداری شد.

بررسی اثر ضد باکتری اسانس‌ها در شرایط گلخانه‌ای

برای انجام این تحقیق در گلخانه از بذرهای گندم ارقام سیروان، چمران و پیشتاز استفاده گردید. خاک مورد استفاده از سه قسمت مساوی خاک زراعی، کود حیوانی و ماسه بود که در کیسه‌های نشاء کوچک با دستگاه اتوکلاو موجود در گلخانه گیاه پزشکی سه بار با فشار بخار آب سترون گردید و به مدت یک ماه برای بازسازی بافت خاک، در گلخانه نگهداری شدند.

تمام بذرها در کیسه‌های نشاء یک کیلویی هم‌شکل و هم‌اندازه در عمق ۲ سانتی متری خاک کاشته شدند. گلدان‌ها هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند تا به مرحله ۳ تا ۴ برگی رسیدند. سپس تیمارها توسط اسانس گیاهان آویشن، رزماری و پونه مایه‌زنی شدند. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد. زمانی که گیاهان به مرحله ۳ تا ۴ برگی رسیدند، اسانس گیاهان آویشن، رزماری و پونه در غلظت ۲۰ mg/ml بر روی برگ گیاهان اسپری شدند. ۲۴ ساعت بعد، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* با غلظت 10^7 سلول باکتری اسپری گردید.

بررسی دینامیک جمعیت باکتری در ارقام مختلف گندم

به منظور بررسی تغییرات جمعیت باکتری در بافت برگ، برگ‌های ارقام مختلف گندم از گلخانه به آزمایشگاه منتقل

تیمار شاهد (بدون اعمال اسانس) تا پنج روز پس از مایه زنی افزایش یافته و بعد از آن سیر نزولی پیدا کرده است (شکل های ۱-۳). تیمار رقم سیروان با اسانس آویشن سبب شده است که افزایش جمعیت باکتری فقط تا سه روز پس از مایه زنی ادامه یابد و پس از آن کاهش پیدا کرده است. دوازده روز پس از مایه زنی باکتری، تیمار آویشن سبب بیشترین کاهش جمعیت باکتری در تمام ارقام شده است (شکل های ۱-۳). در رقم چمران (شکل ۲) و پیشتاز (شکل ۳) هر سه اسانس مورد استفاده سبب کاهش جمعیت باکتری در مقایسه با شاهد شده است. جمعیت باکتری در رقم چمران در بازه زمانی سه روز پس از مایه زنی با هر سه اسانس آویشن دناپی، رزماری و پونه روند صعودی داشته و پس از سه روز جمعیت کاهش پیدا کرده است (شکل ۲). این در حالیست که جمعیت باکتری در گیاه تیمار نشده با اسانس در بازه زمانی پنج روز پس از مایه زنی روند صعودی داشته و پس از پنج روز جمعیت کاهش می یابد. جمعیت باکتری در رقم چمران که توسط اسانس رزماری مایه زنی شده در تمامی بازه زمانی ها نسبت به اسانس پونه و آویشن دناپی بیشتر بود. جمعیت باکتری در رقم پیشتاز در پنج روز و هفت روز پس از مایه زنی در گیاه تیمار نشده با اسانس اختلاف معنی دار ندارند، در صورتی که در یک روز، سه روز و دوازده روز پس از مایه زنی با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند (شکل ۳). جمعیت باکتری در رقم پیشتاز در بازه زمانی پنج روز پس از مایه زنی با هر سه اسانس آویشن دناپی، رزماری و پونه روند صعودی داشته و پس از پنج روز جمعیت کاهش می یابد. این در حالیست که جمعیت باکتری در گیاه تیمار نشده با اسانس در بازه زمانی پنج روز پس از مایه زنی روند صعودی داشته و پس از پنج روز جمعیت کاهش می یابد (شکل ۳). جمعیت باکتری در رقم پیشتاز که توسط اسانس رزماری تیمار شده نسبت به اسانس پونه و آویشن دناپی بیشتر بود.

پرگنه های فلورسنت روی محیط KB و پرگنه های گرد به رنگ کرم روشن یا مایل به زرد با حاشیه صاف روی محیط NA خالص سازی گردید. تمام جدایه ها گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و هوازوی اجباری بودند و در آزمون های گروه LOPAT نتیجه واکنش های اکسیداز، لهیدگی سیب زمینی و آرزنین دهیدرولاز در کلیه سویه ها منفی، اما نتیجه آزمون های لوآن و فوق حساسیت در توتون مثبت بود. سویه ها در آزمون های هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز آسکولین واکنش مثبت نشان دادند. بنابراین همه سویه های انتخابی به عنوان *P. syringae* pv. *syringae* شناسایی شدند. با توجه به یکسان بودن ویژگی های فنوتیپی جدایه ها، یک جدایه که در کوتاه ترین زمان ممکن پس از اسپری روی برگ گندم توانایی تولید علائم مشخص بلایت و لکه برگی را داشت (جدایه W1) برای آزمون های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی دینامیک جمعیت باکتری *Pseudomonas*

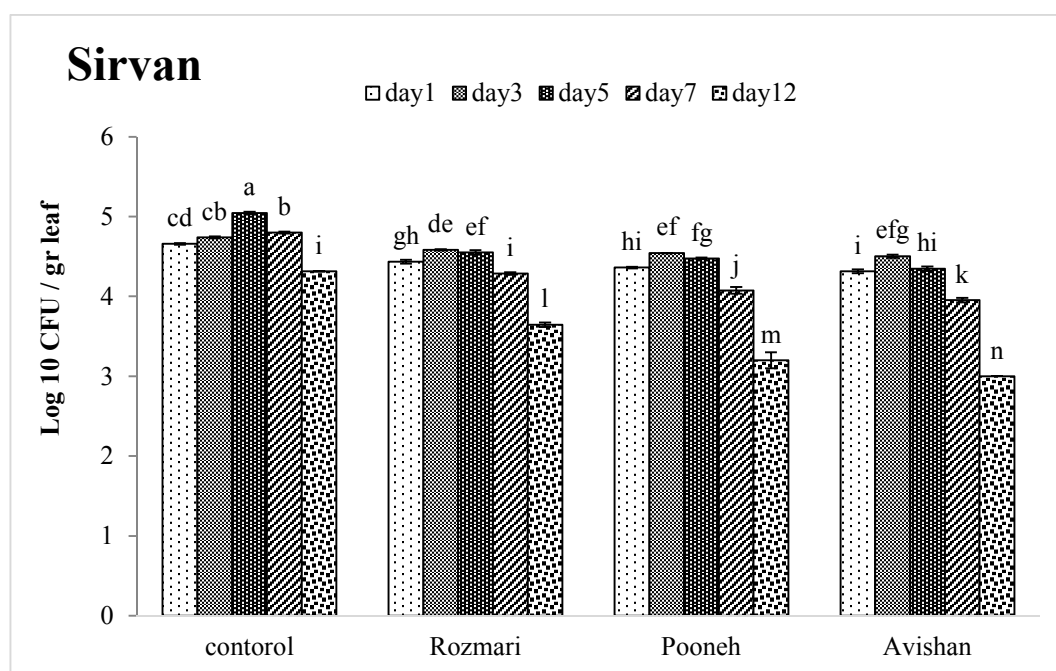
syringae pv. *syringae* در برگ ارقام مختلف گندم

بر اساس نتایج این تحقیق در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم و دوازدهم پس از مایه زنی باکتری، اثر اسانس و اثر رقم هر یک جداگانه در سطح ۱٪ معنی دار می باشد. اثر متقابل باکتری و رقم در روزهای اول، سوم، هفتم و دوازدهم پس از مایه زنی باکتری در سطح ۱٪ معنی دار می باشد اما در روز پنجم معنی دار نمی باشد (جدول ۲). بررسی جمعیت باکتری *PSS* در برگ های ارقام مختلف گندم نشان می دهد که تمامی اسانس های مورد استفاده سبب کاهش جمعیت باکتری در مقایسه با شاهد شدند. در رقم سیروان در تمامی بازه های زمانی شمارش جمعیت باکتری توسط اسانس هر سه گیاه مورد استفاده، کاهش جمعیت مشاهده گردید (شکل ۱). در هر سه رقم گندم مورد استفاده، افزایش جمعیت باکتری در

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر اسانس‌های رزماری، پونه و آویشن دنايي بر لگاریتم جمعیت باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در ارقام سیروان، چمران و پیشتاز گندم در بازه زمانی ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
روز دوازدهم	روز هفتم	روز پنجم	روز سوم	روز اول		
۸/۲۴۰**	۱/۴۲۹**	۱/۶۷۶**	۰/۲۹۲**	۰/۳۴۶**	۳	اسانس
۳/۰۴۲**	۰/۲۰۶**	۰/۲۶۸**	۰/۲۸۹**	۰/۲۷۴**	۲	رقم
۰/۲۶۲**	۰/۰۷۰**	۰/۰۰۱ns	۰/۰۰۴**	۰/۰۰۲**	۶	اسانس×رقم
۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۶	۴۲	خطا
۱/۶۰۲	۰/۸۳۹	۰/۶۶۱	۱/۵۵۴	۰/۵۹۲	-	ضریب تغییرات (%)

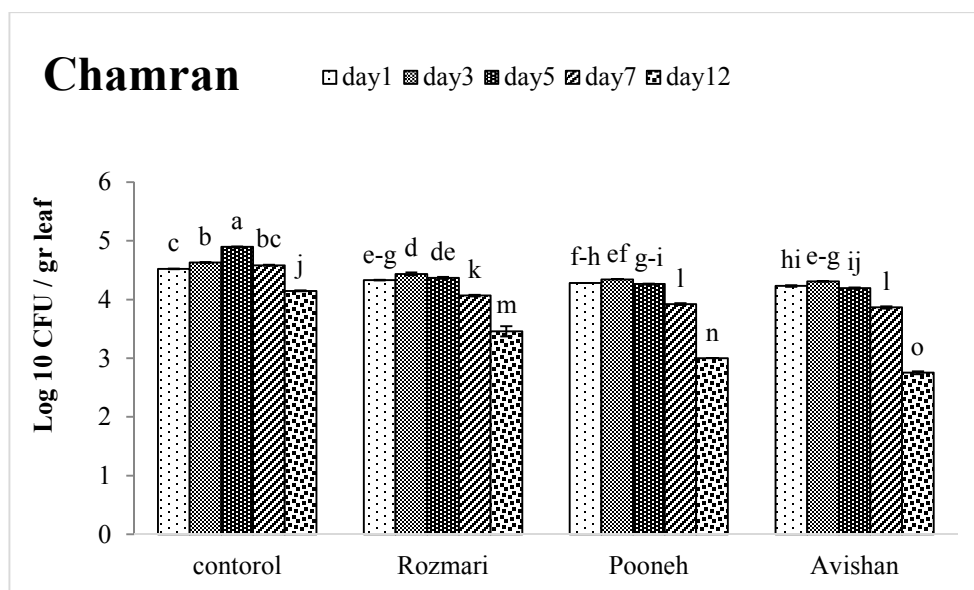
ns و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱٪



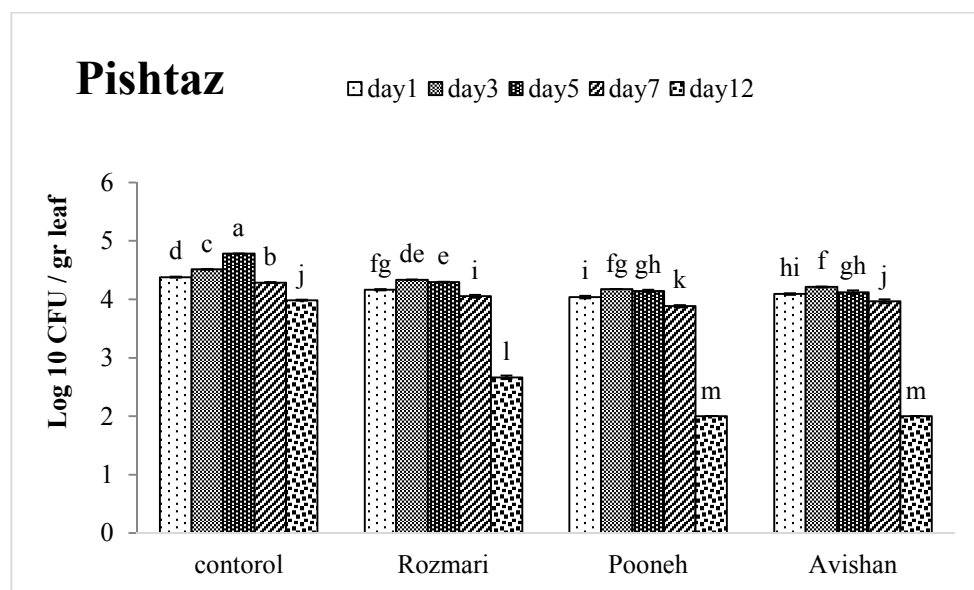
شکل ۱- بررسی دینامیک جمعیت باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در برگ گندم رقم سیروان، تحت تأثیر اسانس‌های

رزماری، پونه و آویشن دنايي در بازه زمانی ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی

حروف مشابه روی هر ستون براساس روش چند دامنه‌ای دانکن بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.



شکل ۲- بررسی دینامیک جمعیت باکتری *Pseudomonas syringae pv. syringae* در برگ گندم رقم چمران، تحت تأثیر اسانس‌های رزماری، پونه و آویشن دنیایی در بازه زمانی ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی حروف مشابه روی هر ستون براساس روش چند دامنه‌ای دانکن بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.



شکل ۳- بررسی دینامیک جمعیت باکتری *Pseudomonas syringae pv. syringae* در برگ گندم رقم پیشتاز، تحت تأثیر اسانس‌های رزماری، پونه و آویشن دنیایی در بازه زمانی ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۲ روز پس از مایه‌زنی حروف مشابه روی هر ستون براساس روش چند دامنه‌ای دانکن بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

باکتری، اثر اسانس و اثر رقم و اثر متقابل اسانس×رقم در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳).

بررسی بیماری‌زایی باکتری بلایت گندم بر روی ارقام مختلف گندم تیمار شده با اسانس‌های مختلف براساس نتایج این تحقیق ۳۰ روز پس از مایه‌زنی

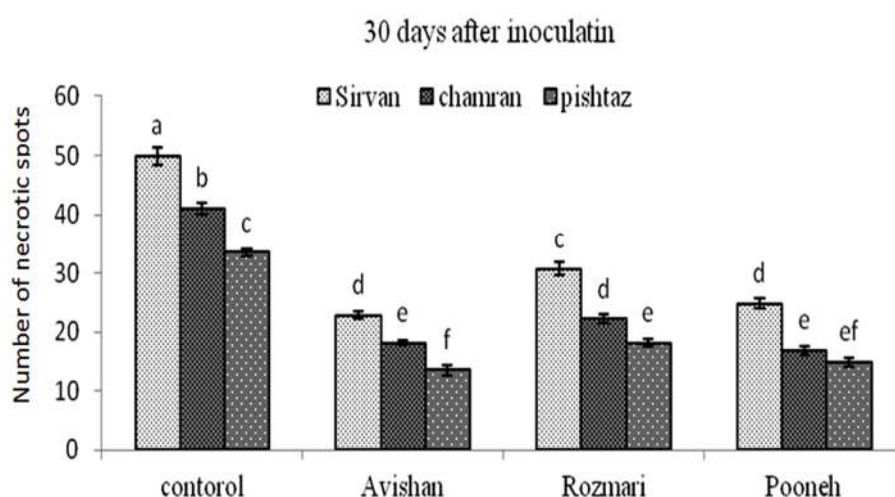
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر اسانس‌های رزماری، پونه و آویشن دناپی بر شدت بیماری‌زایی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در ارقام سیروان، چمران و پیشتاز گندم ۳۰ روز پس از مایه‌زنی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
اسانس	۳	۲۱۳۴/۸۳***
رقم	۲	۸۸۷/۵۱***
اسانس×رقم	۶	۱۸/۹۰***
خطا	۶۰	۴/۲۸
ضریب تغییرات (%)	-	۶/۵

***: معنی‌دار در سطح ۱٪

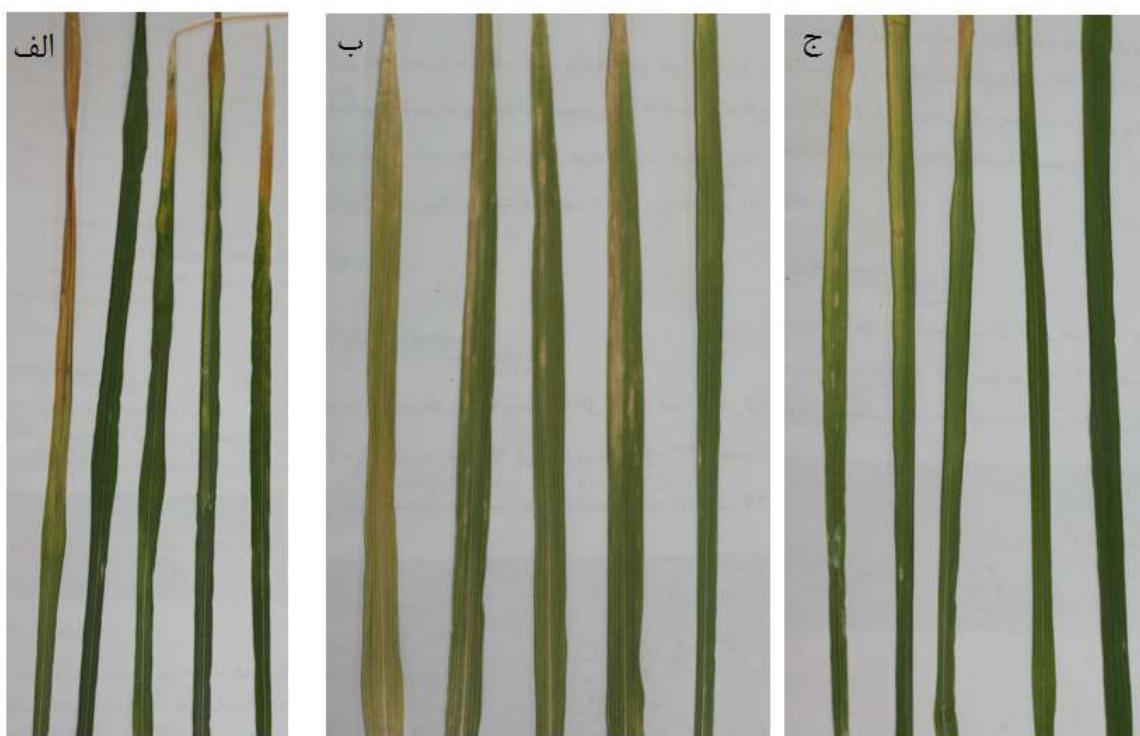
رزماری عملکرد بهتری داشتند. اسانس‌های آویشن و رزماری بیشترین کاهش درصد ناحیه نکروز برگ را به ترتیب در ارقام پیشتاز، چمران و سیروان سبب شدند (شکل‌های ۴ و ۵)، در حالیکه اسانس پونه روی ارقام پیشتاز و چمران عملکرد مشابهی داشته است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هر سه اسانس مورد استفاده به‌طور معنی‌داری سبب کاهش خسارت بیماری‌زایی باکتریایی گندم در تمامی ارقام مورد استفاده شده است.

بررسی بیماری‌زایی باکتری بر روی ارقام مختلف نشان می‌دهد که در تیمار شاهد (بدون اعمال اسانس) به ترتیب در ارقام سیروان، چمران و پیشتاز بیشترین درصد ناحیه نکروز برگ ایجاد شده است (شکل‌های ۴ و ۵). بنابراین رقم پیشتاز بیشترین مقاومت و رقم سیروان حساسیت را به باکتری عامل بلایت گندم نشان دادند. در تمامی ارقام تیمار شده با اسانس‌های مختلف، درصد ناحیه نکروز برگ به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است. در ارقام سیروان، چمران و پیشتاز، اسانس‌های پونه و آویشن در مقایسه با



شکل ۴- مقایسه میانگین ناحیه نکروز برگ ارقام سیروان، چمران و پیشتاز

حروف مشابه روی هر ستون براساس روش چند دامنه‌ای دانکن بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.



شکل ۵- علائم ایجاد شده توسط باکتری *Pss* روی ارقام مختلف گندم پس از تیمار اسانس‌های رزماری، پونه و آویشن دناپی

الف: رقم سیروان و از چپ به راست: مایه‌زنی با باکتری به تنهایی، مایه‌زنی با آب، تیمار رزماری + باکتری، تیمار آویشن + باکتری، تیمار پونه + باکتری

ب: رقم چمران و از چپ به راست: مایه‌زنی با باکتری به تنهایی، تیمار پونه + باکتری، تیمار آویشن + باکتری، تیمار رزماری + باکتری، مایه‌زنی با آب

ج: رقم پیشناز و از چپ به راست: مایه‌زنی با باکتری به تنهایی، تیمار رزماری + باکتری، تیمار پونه + باکتری، تیمار آویشن + باکتری، مایه‌زنی با آب

بحث

بیماری سوختگی برگ گندم ناشی از باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* انتشار جهانی دارد و هر ساله خسارت زیادی به مزارع گندم وارد می‌کند. اقتصادی نبودن برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها، بروز مقاومت و پایداری در ترکیب‌های مسی در محیط‌زیست از جمله مشکلات کنترل این بیماری می‌باشد (Burt, 2004). استفاده از اسانس‌ها، به‌عنوان جایگزین سموم، اخیراً توجه محققان را به خود معطوف کرده است. این قبیل مواد برای گیاهان غیرسمی هستند و به‌صورت تجزیه شده و همچنین متابولیسم‌های طبیعی گیاه میزبان را هم تحریک می‌کنند. این مواد شامل اسانس‌ها، کینون‌ها، تانن‌ها، فنول‌ها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها و استرول‌ها هستند که به لحاظ خواص بیولوژیکی مختلف آنها مورد استفاده قرار می‌گیرند

(Sun et al., 2014). با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری، مشکلات بکارگیری روش‌های کنترل شیمیایی و در واقع فقدان کنترل مؤثر، هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدباکتریایی سه اسانس آویشن دناپی، پونه و رزماری در کنترل بیماری بلایت باکتریایی برگ گندم بود. در این تحقیق مشخص گردید که تمام اسانس‌های مورد استفاده توانایی کاهش بیماری را در شرایط گلخانه دارند. Beiki و Alizadeh (۲۰۰۶) نشان دادند که اسانس دو گونه نعناع (*Mentha aquatica* و *M. spicata*) بیشترین اثر بازدارندگی را روی باکتری‌های عامل بیماری نواری جو و گندم دارند. Mahmoudi و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که در باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* اسانس آویشن دناپی، زنیان، زیره و نعناع بیشترین اثر و

برابر جمعیت اولیه افزایش می‌یابد (Feil *et al.*, 2005). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که درصد لکه‌های نکروز روی برگ رقم سیروان ۳۰ روز پس از مایه زنی بیشتر از رقم چمران بوده و همچنین درصد لکه‌های نکروز روی برگ رقم چمران بیشتر از رقم پیشتاز می‌باشد. بررسی شدت بیماری زایی در این مطالعه نشان داد که شدت بیماری زایی در سه رقم سیروان، چمران و پیشتاز که با اسانس رزماری تیمار شده بودند بیشتر از ارقامی است که با اسانس پونه و آویشن دناپی تیمار شده بودند. به عبارتی پونه و آویشن دناپی کنترل بهتری نسبت به اسانس رزماری دارند. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که گیاهان رزماری، پونه و آویشن دناپی اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای بر روی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* دارند، بنابراین می‌توان از اسانس و عصاره‌های این گیاهان به‌عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی برای کاهش خسارت ناشی از این باکتری استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

- Badawy, M.E.I. and Abdelgaleil, S.A.M., 2014. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products*, 52: 776-782.
- Beiki, F. and Alizadeh, A., 2006. Antibacterial effects of some herbal essential oils and plant extracts on the causal agent of bacterial leaf streak in wheat and barley. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 13(5): 70-82.
- Bultreys, A. and Kaluzna, M., 2010. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, 92: 21-33.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- D'Amato, S., Serio, A., Chaves-López, C. and Paparella, A., 2018. Hydrosols: biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86: 126-137.
- Dadasoglu, F., Aydin, T., Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., Dİikbas, N. and Mete,

کاکوتی، گشنیز و رزماری دارای اثر متوسط بوده و اسانس مریم‌گلی و آنغوزه تأثیری در جلوگیری از رشد باکتری نداشتند. Dadasoglu و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی خواص ضدباکتریایی ۳۴ گونه گیاهی روی باکتری‌های *Pseudomonas savastanoi*, *Pss*, *E. amylovora* و *Xanthomonas vesicatoria* نشان دادند که اسانس گونه‌های نعناع و آویشن بیشترین بازدارندگی را ایجاد می‌کنند. در حالیکه پونه بیشترین بازدارندگی را روی باکتری *Pss* داشته و بعد از آن اسانس آویشن بیشترین بازدارندگی را داشت و اسانس نعناع دارای اثر بازدارندگی متوسط بوده است. با توجه به نتایج این تحقیق رقم پیشتاز در مقایسه با ارقام دیگر نسبت به باکتری *Pss* مقاوم تر بوده است. در آلودگی‌های باکتریایی مانند بلایت و سوختگی، آلودگی‌های شدید عموماً در ابتدای فصل رشد و در مرحله رشد گیاه میزبان بوجود می‌آید و هنگامی که به تدریج رشد گیاه کامل گردد، گیاه دارای یک نوع مقاومت بلوغ می‌شود که آنرا در برابر آسیب‌های بیمارگر نگه می‌دارد. بنابراین تهیه ارقام مقاوم یکی از راه‌های کاهش بیماری و در نهایت کنترل بیماری می‌باشد ولی دستیابی به ارقام مقاوم نیاز به زمان و صرف هزینه بالا دارد (El-Sadek *et al.*, 1992). بررسی دینامیک جمعیت باکتری *Pss* نشان می‌دهد که هم‌کنش بین باکتری *Pss* در ارقام مختلف گندم سازگار می‌باشد. بررسی روند رشد *Pss* در سه رقم مختلف نشان می‌دهد که افزایش تعداد سلول باکتری در هر گرم بافت برگ در رقم سیروان بیشتر از رقم چمران و پیشتاز می‌باشد، از این‌رو انتظار می‌رود در رقمی که باکتری‌ها رشد بیشتری داشته‌اند نشانه‌های بیماری نیز بیشتر بروز کرده باشد، ولی این گفته صددرصد صادق نیست، زیرا گاهی یک باکتری رشد زیادی داشته ولی سازوکارهای دفاعی گیاه باعث بروز نشانه‌های کمتر شده است. جمعیت باکتری‌ها در واکنش سازگار می‌تواند در طول ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی افزایش یابد و تعداد نهایی سلول باکتری تا ۱۰۰۰۰۰ برابر زادمایه اولیه افزایش یابد ولی در هم‌کنش ناسازگار افزایش جمعیت در طول دو تا چهار روز پس از مایه‌زنی حدود ۱۰ تا ۱۰۰

- Thymbra*) species against important plant pathogens. Asian Journal of Chemistry, 18: 1455-1461.
- Mahmoudi, H., Rahnama, K. and Arabkhani, M.A., 2010. Antibacterial effect essential oil and extracts of medicinal plant on the causal agents of bacterial canker and leaf spot on the stone fruit tree. Journal of Medicinal Plants, 4(36): 34-42.
 - Niknejad, M., Kheyrghoo, M., Pedramfar, H. and Rahimian, H., 2010. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. African Journal of Biotechnology, 9: 2860-2865.
 - Rahimian, H., 1989. The occurrence of bacterial leaf blight in wheat. Abstracts of the 9th Iranian Plant Protection Congress, Mashhad, Iran, 9-14 September: 146.
 - Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, USA, 373p.
 - Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J., Assi, L. and Schwan-Estrada, K.R.F., 2011. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi: 1033-1042. In: Méndez-Vilas, A., (Ed.). Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, 1348p.
 - Sun, Z., Wang, H., Wang, J., Zhou, L. and Yang, P., 2014. Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grown in China. PLoS ONE, 9: 1-15.
 - Taghavi, S.M. and Keshavarz, K., 2003. Identification of the causal agent of bacterial wheat leaf blight in Fars and Kohgiluyeh & Boyer-Ahmad provinces and the reaction of certain wheat cultivars to them. Journal of Water and Soil Science, 6: 171-179.
 - Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G. and Robbs, C.F., 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research, 21: 153-177.
 - E., 2011. Antibacterial activities of extracts and essential oils of three *Origanum* species against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. Journal of Plant Pathology, 93: 271-282.
 - EL-Sadek, S.M.A., Abdel-Latif, M.R., Abdel-Gawad, T.I. and Hussein, N.A., 1992. Bacterial leaf blight disease of wheat in Egypt. Journal of Microbiology, 27: 177-196.
 - Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J.E., Lapidus, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Kyrpides, N.C., Ivanova, N. and Lindow, S.E., 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102: 11064-11069.
 - Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S. and Efferth, T., 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytotherapy Research, 21: 989-994.
 - Gross, D.C. and De Vay, J.E., 1977. Population dynamics and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* in maize and cowpea in relation to the in vitro production of syringomycin. Phytopathology, 67: 475-483.
 - Hasanzadeh, N., 2005. The Essential oil of thyme as a natural plant extract for fire blight control. Biocontrol of Bacterial Plant Diseases Abstracts of the 1st Symposium, Darmstadt, Germany, 23-26 October: 290-292.
 - Joseph, B., Ahmad Dar, M. and Kumar, V., 2008. Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* f. sp. *melongenae* incitant of Brinjal Wilt. Global Journal of Biotechnology, 3(2): 56-59.
 - Kennelly, M.M., Cazorla, F.M., Vicente, A., Ramos, C. and Sundin, G.W., 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. Plant Disease, 91: 4-16.
 - Kizil, S. and Uyar, F., 2006. Antimicrobial activities of some thyme (*Thymus*, *Satureja*, *Origanum* and

Study on antibacterial effects of some essential oils on bacterial blight of wheat under greenhouse conditions

B. Shabani¹, R. Rezaei^{2*}, H. Charehgani³ and A. Salehi⁴

1- M.Sc. graduated, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

E-mail: rrezaei@yu.ac.ir

3- Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

4- Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

Received: August 2018

Revised: December 2018

Accepted: January 2019

Abstract

Wheat bacterial blight disease caused by the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) is one of the important diseases of wheat in the world. The expanding the diseases resistance to chemical compounds has led to the researches into the new antimicrobial agents finding. Studies have shown that plant essential oils induce biological activity against plant pathogenic bacteria and can be used as an environment friendly and safe way to control the disease. These compounds have the least harm to the ecosystem and can be used as an alternative to toxic compounds for controlling plant diseases. This study was designed to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils obtained from the aerial parts of *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata* and *Thymus daenensis*, against *Pss* on wheat cultivars Pishtaz, Sirvan and Chamran under greenhouse conditions. In this study, all essential oil treatments significantly reduced the severity of wheat bacterial blight, especially on Pishtaz cultivar, and the percentage of necrotic area on the leaf 30 days after bacterial inoculation. The highest reduction in the severity of the disease was obtained by *Mentha spicata* and *Thymus daenensi* essential oils. The findings of the present study suggest that essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata* and *Thymus daenensis* are capable to be used as antimicrobial agents.

Keywords: Bacterial blight, essential oil, control, wheat.