فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۳-۱ (۱۳۸۹)

اثر ضد باکتریایی اسانس مرزه و دو سم مسی در کنترل باکتری عامل سرطان طوقه مو

جواد اشرفی[۱] و نادر حسن‌زاده[۲*]

۱- کارشناس، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام
۲*- نویسنده مسئول، گروه بیماری شناسی‌گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، پست الکترونیک: hasanzadehr@yahoo.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۶ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۸

چکیده

نمونه‌های خاک و بافت آلوده به باکتری عامل سرطان طوقه از تاکستانهای استان قزوین اخذ و پس از تهیه سوسپانسیون، نمونه‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) کشت و خالص‌سازی شد. در راستای کنترل عامل بیماری، تأثیر ۱۵ اسانس گیاهی در مقایسه با دو سم مسی از نظر قدرت بازدارندگی مورد بررسی قرارگرفت. به‌طوری که از میان اسانس‌های آزمون شده، اسانس مرزه که دارای بالاترین هاله بازدارندگی (۹ سانتی‌متر) بود جهت مطالعات تکمیلی انتخاب شد و میزان بازدارندگی آن در سه غلظت خالص، 10^{-1} و 10^{-2} در مقایسه با سموم بوردو (۰/۵ درصد) و اکسی کلرور مس (۳ در هزار) مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون‌ها در سه سطح آزمایشگاهی (آزمون برش هویج)، شرایط گلخانه‌ای (تیمار گیاهچه‌های جوان آفتابگردان) و آزمایش میدانی در یکی از تاکستانهای استان قزوین انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان بازدارندگی اثر اسانس مرزه در مقایسه با دو سم مورد آزمایش دو برابر بوده است.

واژه‌های کلیدی: *Agrobacterium tumefaceins*، سرطان طوقه مو، اسانس مرزه، کنترل.

مقدمه

براساس آمار موجود، سطح زیرکشت تاکستانهای دنیا از سال ۱۳۶۱ تا سال ۱۳۷۳ تقریباً دو برابر شده است و تولید این محصول تا سال ۱۳۸۲، ۲۵٪ افزایش رشد را نشان می‌دهد. از عمده‌ترین تولیدکنندگان انگور در دنیا می‌توان از کشورهای فرانسه، ایتالیا، استرالیا، کانادا، یونان، ترکیه، بلغارستان، روسیه و ایران نام برد. سطح زیرکشت درخت مو در دنیا ۲۳۳۷۶۰۰ هکتار است که ۲۹۸۰۰۰ هکتار آن متعلق به ایران است (آمارنامه کشاورزی سازمان خواربار جهانی، ۲۰۰۶). از این تعداد، ۹۱/۳۵٪ درختان بارور و ۸/۶۵٪ آن تاکستانهای جوان و جدیدالاحداث هستند که هنوز به مرحله باروری نرسیده‌اند. استان فارس با ۲۰/۶۸٪ سطح زیرکشت تاکهای بارور، بیشترین سطح و استان بوشهر با ۱۷ هکتار (۰/۰۰۶٪) کمترین سطح زیرکشت بارور را دارا می‌باشند. استانهای خراسان، قزوین، آذربایجان‌غربی و شرقی و همدان با مجموع ۵۰٪ سطح زیرکشت درختان بارور به‌ترتیب، مقام دوم تا ششم کشور را به خود اختصاص داده‌اند (تفضلی و همکاران، ۱۳۷۰).

یکی از عوامل محدودکننده تولید محصول انگور در جهان بیماری باکتری عامل سرطان طوقه

A. Tumefaciens (=*R. radiobacter*) می‌باشد. در ایران این بیماری بر روی گیاهان زراعی و باغی متعددی گزارش شده است. اما بر روی درخت مو، تعداد ۹ گزارش رسمی از مناطق استانهای فارس، کهکیلویه، قزوین، خراسان، تهران، آذربایجان غربی، اردبیل و شهر کرج موجود می‌باشد (محمودزاده و همکاران، ۱۳۸۱؛ آل‌یاسین و بنی‌هاشمی، ۱۳۷۲؛ جواهری و همکاران، ۱۳۷۹؛ امانی، ۱۳٤٥؛ فاتحی پیکانی، ۱۳۷٦؛ صالحی و همکاران، ۱۳۸۳؛ ایرانی و قاسمی، ۱۳۸۳).

برای کنترل این بیماری تاکنون روشی که بتواند به‌طور کامل آن را ریشه‌کن نماید گزارش نشده است (Burr *et al*., 1998). از روشهای معمول برای مهار این بیماری، سموم مسی، حرارت درمانی (محمودزاده و همکاران، ۱۳۸۱)، عوامل بیوکنترل K84 (Kerr & Htay, 1974)، باکتری تراریخت K1026 (Jones *et al*.,1991) و نیز استفاده از بعضی عصاره‌های گیاهی (Alsup, 2004) به‌ویژه عصاره سیر می‌باشد (Cabrera, 2003).

در این تحقیق، تأثیر اسانس مرزه در کنترل این بیماری تا مرحله میدانی برای اولین بار بررسی و گزارش می‌شود.

مواد و روشها

جداسازی باکتری از گال مو

نمونه‌برداری از بافت گال عمدتاً از باغ مرکز آموزش جهاد کشاورزی استان قزوین که حدوداً دارای ده هزار بوته درخت مو با سابقه طولانی آلودگی طوقه بود، انجام شد. زمان نمونه‌برداری از اواسط خردادماه تا اوایل آبان‌ماه ادامه یافت. بافت گالها در آزمایشگاه با محلول ۱٪ هیپرکلریت سدیم به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر استریل، به قطعات کوچک با ابعاد حدود یک میلی‌متر مربع با اسکارپل استریل تقسیم و در هاون چینی له شد. سوسپانسیون‌های بدست آمده به لوله‌های حاوی ۱۰ml آب مقطر استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه شیکر شدند. مقدار ۲۰ تا ٤۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) قرار داده شد و به کمک لوپ شیشه‌ای به شکل L در سطح محیط کشت‌ها پخش شدند. پتری‌ها به مدت ۷۲-۲٤ ساعت در داخل انکوباتور در دمای ۲۰°C نگهداری و به‌طور روزانه مورد بازبینی قرار گرفتند (حسن‌زاده، ۱۳۷٤).

جداسازی باکتری از خاک

برای جداسازی باکتری‌ها از خاک مقدار یک گرم از خاک پای بوته‌ها به لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شد و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه شیکر شدند. در مواردی که سوسپانسیون‌ها مکدر بودند از سری رقت ۱:۲ تا رقت ۱۰ برابر استفاده شد. روش کشت سوسپانسیون‌ها مشابه مورد بافت گال بود، با این تفاوت که برای حذف باکتری‌های ساپروفیت از محیط مرکب از D1 کشت تغییر یافته زیر استفاده شد (Perry & Kado, 1982).

Cellobiose 5 g; NH_4Cl 1 g; Na_2HPO_4 1 g; K_2HPO_4 1 g; Mg $SO_4.7$ H_2O 3 g;
Malachite green 10 mg; Agar 15 g; D. H_2O 1 L; pH =7

مقدار ۳۰-۲۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون حاصل از عصاره خاک به کمک سمپلر روی محیط کشت D1M اضافه شد و به کمک لوپ میله‌ای شیشه‌ای L شکل در سطح محیط کشت پخش شد.

اثبات بیماری‌زایی

تعداد ۱۰ استرین از باکتری‌های عامل گال و ۱۰ استرین از کلونی‌های بدست آمده از خاک انتخاب و پس از اثبات بیماری‌زایی ایزوله‌های منتخب از آنها برای ادامه آزمایشها استفاده شد.

اثبات بیماری‌زایی باکتری پاتوژن بر روی دیسک‌های هویج و گیاه گوجه‌فرنگی در سه تکرار به قرار زیر انجام شد:

الف- اثبات بیماری‌زایی روی دیسک‌های هویج

به منظور انجام تست اثبات بیماری‌زایی روی دیسک‌های هویج، از روش Fahy و Persley (۱۹۸۳) استفاده شد. ابتدا خاک همراه ریشه‌های تازه هویج زیر شیر آب شسته شد و بعد برای اطمینان از نبود ذرات خاک در داخل درز و شکاف‌های پوست هویج، نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه داخل آب قرار داده شدند. سپس ریشه‌های هویج در ظرف محتوی وایتکس (۰/۵٪) به مدت ۱۰-۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شد. بعد ۳ بار با آب مقطر استریل به مدت ۱۰،۵ و ۱۲ دقیقه شستشو شدند.

هویج‌ها را زیر هود استریل درون پتری‌هایی که از قبل آماده شده بودند و حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب بودند، به قطعات ۵ میلی‌متری برش داده و تعداد ۲ یا ۳ قطعه از هر برش در داخل پتری‌های استریل قرار داده شدند و سطح قاعده ریشه به سمت بالا قرار گرفت. به‌طوری که سطح برشها با مقدار ۱۵-۱۰ µl از سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی 10^6 cfu/ml کاملاً پوشانده شدند. بعد دور پتری‌ها را با پارافیلم پوشانده و در دمای اطاق (۲۵°C) نگهداری شدند. هر ۳ یا ٤ روز یک‌بار میزان رطوبت داخل پتری‌ها بازبینی شد. بعد از گذشت ۲۰-۱۰ روز، ایزوله‌های بیماری‌زا بافت هویج را تغییر رنگ داده و در سطح برشها گالهایی سبزرنگ بوجود آمد. پتری‌های شاهد که فقط با آب تیمار شده بودند، فاقد علائم مذکور بودند.

برای اطمینان از وجود باکتری عامل سرطان طوقه، کشت مجدد از گالهای سطح برش هویج انجام شد.

ب- اثبات بیماری‌زایی روی گیاه گوجه‌فرنگی

برای آزمون اثبات بیماری‌زایی روی گیاه گوجه‌فرنگی از گیاهچه‌های با سن ۳۰-۲۰ روز استفاده شد. همزمان چند روش تلقیح مورد مطالعه قرار گرفت که به‌طور خلاصه جزئیات این روشها به شرح زیر می‌باشد:

۱- به کمک سرنگ استریل مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *A. tumefaciens* با غلظت 10^9 cfu/ml به ساقه یا زیر گره‌های ساقه و یا در قسمت طوقه گیاه تزریق شد.

۲- سطح پوست گیاه با نوک سوزن سرنگ استریل خراش داده شد و پس از تماس محل زخم با سوسپانسیون باکتری، محل زخم با پارافیلم پوشانیده شد.

۳- یک برگ از انتهای ساقه را قطع کرده و محل قطع شده با سوسپانسیون غلیظ یا کلنی خالص باکتری آلوده شد. بعد محل آلودگی با پارافیلم پوشانیده شد.

٤- ریشه و طوقه گیاهچه‌ها با سوزن آلوده به سوسپانسیون باکتری آلوده شده و در خاک استریل مجدداً کشت شدند. سطح گلدانهای تیمار شده به مدت ۳-۱ روز با پلاستیک شفاف پوشانیده شد. سپس پلاستیک‌ها را برداشته و پس از ۱۵-۱۰ روز، بروز احتمالی برجستگیهای سطح ساقه مورد بازبینی قرار گرفت. برای اطمینان از بیماری‌زا بودن باکتری، شیره ساقه و گال گیاهان تیمار شده روی محیط کشت NA کشت و پس از جداسازی

مجدد، آزمون بیماری‌زایی با یکی از روشهای بالا مجدداً انجام شد. وجود علائم مشابه مؤید بیماری‌زا بودن باکتری بود.

شاهد آزمونهای مرتبط با بیماری‌زایی به صورت زخم بدون ایجاد آلودگی مصنوعی و نیز زخم همراه با آب بود.

تهیه اسانس مرزه

اسانس مرزه و ١٤ اسانس دیگر از مرکز تحقیقات آفت‌کش‌ها و کود (کرج) تهیه شد. روش معمول اسانس‌گیری در مرکز فوق، تقطیر با آب (hydro-distillation) با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ٣ ساعت بود.

ارزیابی اثر ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی

اسانس‌های تولید شده به روش مستقیم و اسانس مرزه به دو روش مستقیم و غیرمستقیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. در روش مستقیم، اسانس‌های مورد بررسی هر کدام به مقدار ٤ µl به داخل چاهک‌های ایجاد شده بر روی محیط کشت NA اضافه و پس از جذب اسانس‌ها، سطح پتری‌ها با باکتری *A. Tumefaciens* اسپری شد. پس از ٣ روز از انکوباسیون پتری‌ها، میانگین هاله‌های بازدارندگی اندازه‌گیری و ثبت شد. آزمون فوق در ٣ تکرار انجام شد. تیمارهای دیگر این آزمون شامل اکسی کلرور مس ٣ در هزار و محلول بوردو (٠/٥٪) بود و از آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد.

در روش غیرمستقیم ابتدا سوسپانسیون مکدر باکتری به غلظت 10^{7} cfu/ml به‌طور یکنواخت روی سطح محیط کشت NA پاشیده شد و بعد مقدار ١٠ میکرولیتر از اسانس مرزه در قسمت داخلی درب پتری اضافه گردید. پس از گذاشتن درب پتری‌ها دور آنها با پارافیلم پوشانده شد و به صورت وارونه در دمای ٢٥°C انکوبه شدند. در اینجا از سموم اکسی کلرور مس ٣ در هزار، محلول بوردو ٠/٥٪ و آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد.

اثر ضد باکتریایی اسانس مرزه بر روی دیسک‌های هویج

در این آزمون، اثر ضد باکتریایی اسانس خالص مرزه و دو رقت 10^{-1} و 10^{-2} حاصل از آن با محلول بوردو ٠/٥٪ و اکسی کلرور ٣ در هزار مقایسه شد.

مراحل ضدعفونی برشهای هویج همانند روش اثبات بیماری‌زایی انجام شد. پس از قرار دادن برشها در درون پتری‌های حاوی کاغذ مرطوب استریل سطح برشها با مقدار ١٠٠ µl از دو سم شیمیایی و اسانس مرزه در غلظت‌های ذکر شده پوشانده شد. هر تیمار دارای سه تکرار و هر تکرار دارای سه برش هویج بود. شاهد مثبت آزمون، تیمار برشها با باکتری و شاهد منفی تیمار با آب مقطر بود.

پس از مدت ١/٥-١ ساعت که اسانس مرزه و سموم مسی به خوبی جذب برشهای هویج شدند، مقدار ١٠ میکرولیتر از سوسپانسیون مکدر باکتری با غلظت ١٠٨ cfu/ml روی هر کدام از برشها قرار داده شد و داخل هر کدام از پتری‌ها مقدار ٣-٢ ml آب مقطر استریل برای حفظ رطوبت محیط اضافه شد. پتری‌ها در دمای ٢٥°C انکوباتور نگهداری شدند. هر ٤-٣ روز میزان رطوبت آنها بررسی و تأثیر اسانس در مقایسه با سموم مسی مورد مطالعه قرار گرفت. پس از گذشت دو هفته نتایج قرائت و یادداشت‌برداری شد.

اثر ضد باکتریایی اسانس مرزه بر روی گیاه آفتابگردان

بدین منظور از اسانس مرزه با غلظت‌های خالص، 10^{-1} و 10^{2} استفاده شد و از دو تیمار ایجاد زخم سطحی

بدون آلودگی مصنوعی و ایجاد زخم سطحی با آلودگی مصنوعی با باکتری *A. tumefaciens* به‌ترتیب به‌عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده شد.

اما تیمارهای اصلی آزمون که در شرایط گلخانه انجام شد شامل:

۱- تلقیح باکتری به محل خراش ساقه و تیمار محل تلقیح بلافاصله با اسانس/سم

۲- تیمار سطح خراش داده شده ساقه با اسانس/سم و افزودن بلافاصله باکتری

۳- آلودگی سطح ساقه با باکتری و پاشیدن اسانس/سم یک ساعت بعد

٤- ایجاد زخم در آوند گیاه و تیمار محل زخم با اسانس و اسپری باکتری یک ساعت بعد از تیمار با اسانس/سم

نتایج آزمونهای فوق بعد از گذشت ۱۵-۱۰ روز ثبت و ضبط شد.

تأثیر ضد باکتریایی اسانس مرزه در مقایسه با سموم مسی در شرایط باغ

این آزمایش در باغ مو آلوده به سرطان طوقه مرکز آموزش جهاد کشاورزی واقع در شهرستان قزوین انجام شد. برای انجام این آزمایش نیز از اسانس مرزه خالص و دو رقت 10^{-1} و 10^{-2} و دو سم مسی اکسی کلرور مس ۳ در هزار و محلول بوردو ۰/۵٪ استفاده شد.

برای انجام این آزمون از طرح بلوکهای کامل تصادفی در سه تیمار/ تکرار استفاده شد.

ابتدا گالهای موجود درختان مورد نظر شمارش و بعد قسمتی از گالها با چاقوی استریل تراشیده شدند. سپس محل تراشها با اسانس مرزه و سموم مسی در غلظت‌های ذکر شده آغشته شدند. مقداری از گالهای تراشیده شده جهت تعیین جمعیت به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از گذشت حدود یک ماه مجدداً از باغ و محل گالها بازدید و روند توسعه یا توقف گالها در مقایسه با درختان شاهد مورد بازبینی و آماربرداری قرار گرفت.

نتایج

علائم بیماری

بیماری همراه با تقسیم ناهنجار سلولی و غیرمنظم اغلب در ناحیه ریشه و اطراف طوقه گیاهان ظاهر می‌شود. اما گاهی اوقات که بیماری زیاد و شدید است ممکن است که گالهای کوچکی در ناحیه رگبرگ‌ها و قسمتهای بالایی شاخه و ساقه‌ها نیز دیده شود. فرق گال این باکتری با باکتری‌های دیگر نیز همین است. گال حاصل از این باکتری نرم و سفید رنگ است و به راحتی از دیگر برآمدگیهای سفت و چوبی گیاهی قابل تمیز است. نرمی بافت گال باعث می‌شود که ساپروفیت‌های زیادی در آن رشد و تکثیر یابند و بتدریج بافت گال از بیرون حالت چوپ پنبه‌ای و از درون حالت چوبی پیدا کند.

جداسازی باکتری از بافت گال

در بیشتر نمونه‌های مو که دارای علائم تیپیک بیماری بودند باکتری بیماری‌زا جداسازی شد. در جداسازی استرین‌های *A. tumefaciens* توجه به این نکته حائز اهمیت است که گال‌های باکتریایی نسبتاً نرم است و به راحتی از دیگر برآمدگیهای سفت و چوبی گیاه قابل تشخیص است و سطح آن لطیف و سبز رنگ است. درنتیجه بهترین موقع نمونه‌برداری از اواسط خردادماه تا اوایل آبان‌ماه است.

جداسازی باکتری از خاک

برای جداسازی موفق باکتری از خاک حداقل میزان جمعیت باکتری در هر گرم خاک cfu ۱۰۳ می‌باشد، به‌طوری که در جمعیت‌های پایین امکان جداسازی باکتری پاتوژن بدلیل حضور بالای باکتری‌های ساپروفیت بسیار دشوار است. بنابراین برای پرهیز از اتلاف وقت و انرژی، سوسپانسیون‌های بدست آمده از عصاره‌های خاک به کمک سمپلر روی محیط کشت D1M کشت شدند.

شناسایی عامل بیماری گال طوقه (*A. tumefaciens*)

مشخصات ایزوله‌های باکتریایی مورد بررسی با توصیف این باکتری در منابع معتبر باکتری‌شناسی نظیر Schaad و همکاران (۲۰۰۱) و Fahy و Persley (۱۹۸۳) منبطق بود.

تمام باکتری‌ها گرم منفی، دارای رشد روی محیط کشت حاوی ۲٪ نمک طعام و دارای تحرک در pH=۷ بودند. اکسیداز و تولید کیتولاکتوز مثبت و واکنش به اسید تارتاریک و مالونات بازی بود. آزمون پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در مورد کلیه ایزوله‌ها منفی بود.

اثبات بیماری‌زایی روی گیاه گوجه‌فرنگی

اثبات بیماری‌زایی روی گیاه محک و حساس گوجه‌فرنگی در هر چهار روش تیمار شده مثبت بود و پس از ۱۵-۱۰ روز علائم بیماری به صورت برجستگیهای سطح ساقه مشاهده شد (شکل ۱).

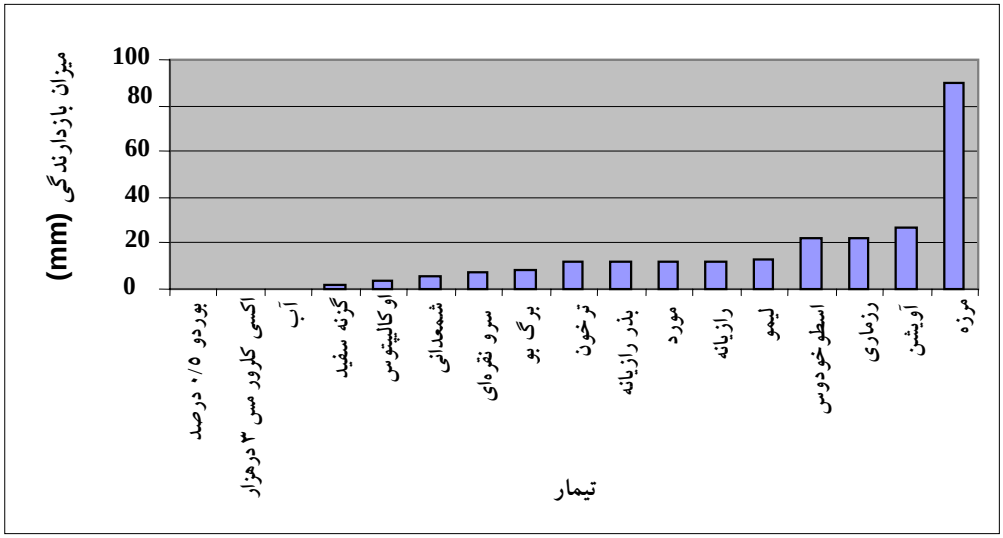
میزان بازدارندگی اسانس مرزه و سموم مسی روی محیط کشت NA (روش مستقیم)

پس از مدت ۷۲-۲٤ ساعت از انکوباسیون پتری‌ها، قطر هاله‌های بازدارندگی در سطح پتری‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۲). تکرار این آزمون در سال بعد موجب کاهش قطر هاله‌ها شد که این امر بیانگر کاهش اثر ضد باکتریایی اسانس مرزه و احیاناً اسانس‌های دیگر با گذشت زمان است.

اثر ضد باکتریایی اسانس مرزه به روش غیرمستقیم

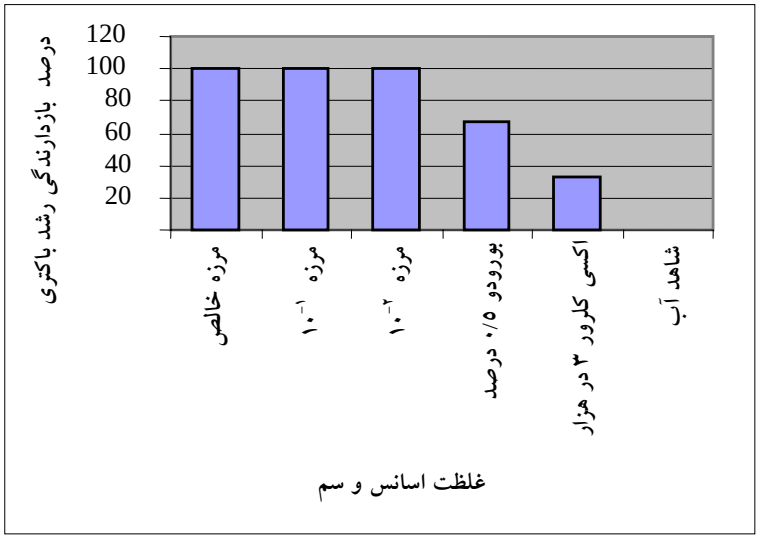
با انجام این آزمایش مشخص شد که اسانس مرزه دارای مواد فرّاری است که به‌طور غیرمستقیم بر روی رشد باکتری تأثیر گذاشته و مانع رشد آن می‌شود. مطابق شکل ۳، هیچ کلنی بر روی پتری‌های مورد آزمایش مشاهده نشد.

شکل ۱- ظهور علائم گال بر روی ساقه گوجه‌فرنگی در اثر تلقیح مصنوعی با باکتری *A. tumefacien*



شکل ۲- میانگین قطر هاله‌های بازدارندگی رشد باکتری پاتوژن توسط اسانس و سموم مسی روی محیط کشت NA

شکل ۳- ارزیابی اثر غیرمستقیم ضد باکتریایی اسانس مرزه



شکل ٤- مقایسه درصد بازدارندگی رشد باکتری پاتوژن توسط اسانس و سموم مسی بر روی برشهای هویج

اثر بازدارندگی اسانس مرزه در مقایسه با سموم مسی روی دیسک‌های هویج

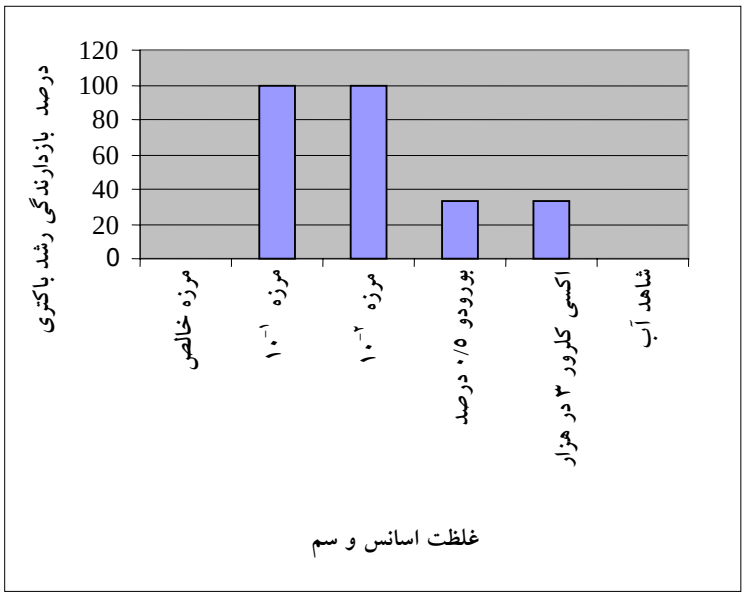
مطابق شکل ٤ نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که کاربرد هر سه رقت اسانس روی برشهای هویج مانع تشکیل بافت سرطانی می‌شود و قدرت بازدارندگی آنها به میزان ۱۰۰ درصد بوده است.

در مورد محلول بوردو میزان بازدارندگی آن ٦٦/٦٦درصد تعیین گردید و نیز مشاهده شد که یکی از برشها حالت سرطانی دارد. در خصوص اکسی کلرور مس، از سه برش هویج تیمار شده، ۲ برش حالت سرطانی داشت که در نتیجه میزان بازدارندگی آن به مقدار ۳۳/۳۳ تنزل یافت (شکل ۵).

اثر بازدارندگی اسانس مرزه و سموم شیمیایی بر روی گیاهچه آفتابگردان

در آزمایش اول، تأثیر تلقیح باکتری به محل خراش ساقه و تیمار محل تلقیح بلافاصله با اسانس/سم روی گیاهچه‌های آفتابگردان در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. طبق شکل ٦، اسانس مرزه در غلظت خالص موجب گیاه‌سوزی شد. اما در رقتهای 10^{-1} و 10^{-2} موجب عدم رشد باکتری *A. tumefaciens* شد. سم بوردو ۰/۵٪ و اکسی کلرور مس ۳ در هزار با ۳۳/۳۳٪ کاهش آلودگی دارای کمترین میزان بازدارندگی رشد باکتری بودند.

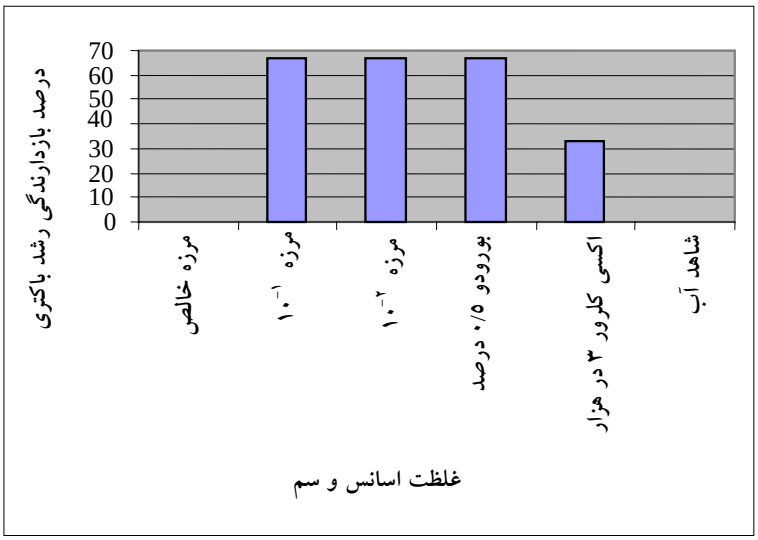
شکل ۵- جلوگیری از تشکیل گال توسط اسانس مرزه (راست) و تشکیل گال در تیمارهای مربوط به سموم مسی (چپ)



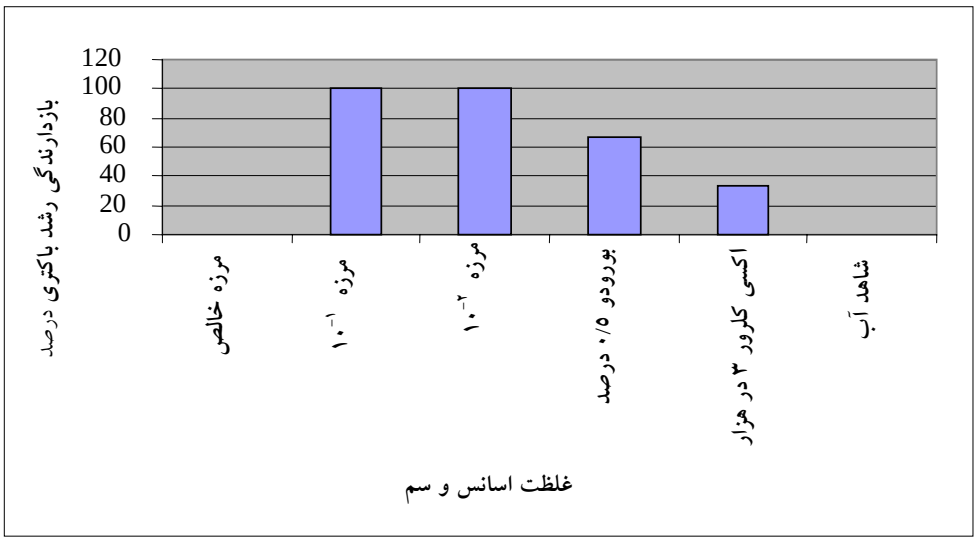
شکل ٦- تأثیر تیمار سم و اسانس مرزه بلافاصله بعد از تلقیح باکتری به بافت ساقه گیاهچه‌های آفتابگردان

در آزمایش دوم، تأثیر تیمار ساقه گیاهچه‌های آفتابگردان با اسانس/سم و تلقیح بلافاصله باکتری در شرایط گلخانه بررسی شد. به‌نحوی که مطابق با شکل ۷، اسانس مرزه در غلظت خالص موجب گیاه‌سوزی شد. اما در رقتهای 10^{-1} و 10^{-2} مانع رشد باکتری *A. tumefaciens* شد.

در آزمایش سوم تأثیر سم و اسانس مرزه با فاصله یک ساعت بعد از تلقیح باکتری به بافت ساقه گیاهچه‌های آفتابگردان در شرایط گلخانه بررسی شد؛ به‌طوری که مطابق شکل ۸ اسانس مرزه در غلظت خالص موجب گیاه‌سوزی شد، اما در رقتهای 10^{-1} و 10^{-2} مانع رشد باکتری *A. tumefaciens* شد.



شکل ۷- تأثیر تیمار سم و اسانس مرزه بلافاصله قبل از تلقیح باکتری به بافت ساقه گیاهچه‌های آفتابگردان



شکل ۸- تأثیر سم و اسانس مرزه با فاصله یک ساعت بعد از تلقیح باکتری به بافت ساقه گیاهچه‌های آفتابگردان

در آزمایش چهارم که تأثیر اسانس و سم با فاصله یک ساعت قبل از تلقیح باکتری بر روی گیاهچه‌های آفتابگردان در شرایط گلخانه بررسی شد، طبق شکل ۹ اسانس مرزه بجز در غلظت خالص که موجب گیاه‌سوزی شد، در رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} به میزان ٦٦/٦٦٪ موجب بازدارندگی رشد باکتری شد.

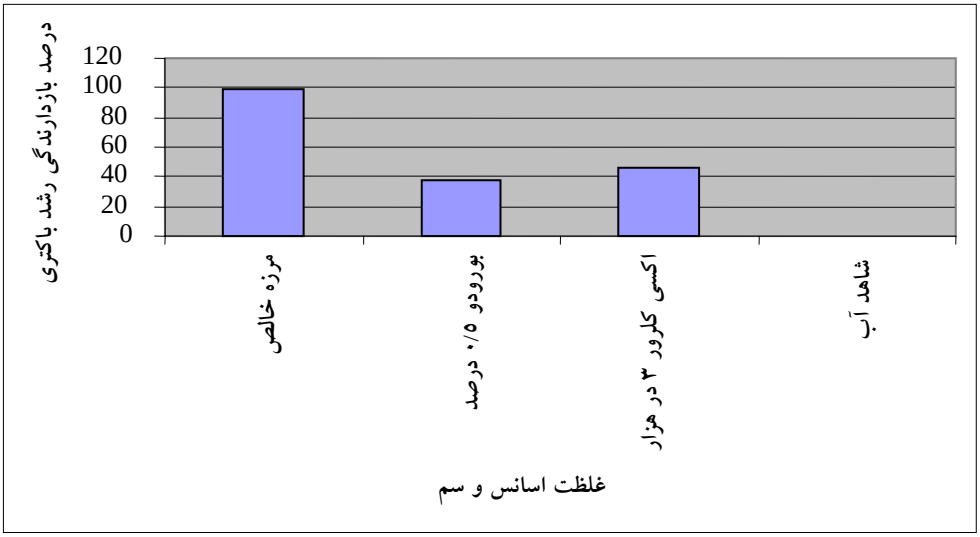
محلول بوردو ۰/۵٪ و اکسی کلرور مس ۳ در هزار به میزان ۳۳/۳۳٪ کمترین تأثیر را در بازدارندگی رشد باکتری داشتند (شکل ۱۰).

بررسی اثر اسانس در مقایسه با سموم مسی در شرایط مزرعه بر روی درخت مو

مطابق شکل ۱۱، اسانس مرزه خالص جمعیت باکتری را به میزان ۹۹/٦٪ کاهش داد. این کاهش در خصوص محلول بوردو و اکسی کلرور مس کمتر از ۵۰٪ و به‌ترتیب به میزان ۳۸/۳٤ و ٤٦٪ بود. به عبارت دیگر اسانس مرزه حدوداً دو برابر نسبت به سموم مسی اثر بازدارندگی روی باکتری سرطان طوقه داشت.

شکل ۹- تأثیر اسانس و سم با فاصله یک ساعت قبل از تلقیح باکتری بر روی گیاهچه‌های آفتابگردان

شکل ۱۰- ظهور علائم گال بر روی ساقه آفتابگردان پس از تلقیح با باکتری *A. tumefacien*



شکل ۱۱- مقایسه تأثیر اسانس نسبت به سم در کاهش جمعیت باکتری عامل سرطان طوقه

بحث

نتایج تحقیقات باکتری‌شناسی نشان داد که عامل بیماری سرطان طوقه در تاکستانهای استان قزوین *Agrobacterium tumefaciens* (=*R. radiobacter*) است و موردی از وجود گونه *A. vitis* مشاهده نشد.

در خصوص مقایسه تأثیر بازدارندگی اسانس‌های گیاهی نسبت به دو سم مسی (اکسی کلرور مس و محلول بوردو) و سه مشتق گیاهی دیگر شامل عرق مریم‌گلی و شاهدانه و جوشانده گزنه سفید مشخص شد که کلیه اسانس‌های مورد بررسی از کارایی بالایی در کنترل باکتری عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی برخوردار بودند. طبق شکل ۲، اسانس مرزه با ایجاد ۹۰ میلی‌متر قطر هاله بازدارندگی و اسانس اوکالیپتوس با تشکیل ٤ میلی‌متر قطر هاله بازدارندگی، به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی در سطح محیط کشت NA بودند. اثر بازدارندگی اسانس گیاهان آویشن، اسطوخودوس و رزماری از خانواده نعناعیان کاملاً محسوس و قابل تأمل بود، اما برای تکمیل مراحل مختلف این تحقیق صرفاً از اسانس مرزه استفاده شد. اسانس مذکور در هر سه سطح (آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و میدانی) روی سه گیاه مورد آزمایش (هویج، آفتابگردان و مو) و در هر سه غلظت (خالص و رقتهای 10^{-1} و 10^{-2}) دارای بیشترین و پایدارترین قدرت بازداری رشد باکتری پاتوژن بود. در بیشتر تیمارها، رقت 10^{-2} اسانس مرزه نیز مؤثر بود و زمان تلقیح باکتری قبل یا بعد از تیمار با اسانس، تأثیری در قدرت بازدارندگی اسانس مرزه نداشت. همچنان که در مقدمه این مقاله نیز آمد این اولین گزارش از کاربرد اسانس گیاهی و به‌طور مشخص مرزه علیه عامل بیماری سرطان طوقه مو است و نتایج بدست آمده نویدبخش کاربرد روش جایگزین دیگر علیه این باکتری بسیار مهم گیاهی می‌باشد. کاهش تدریجی قدرت پایداری اسانس مرزه در یک‌سال اجرای این تحقیق قابل تأمل بود، اما این امر در مقایسه با عدم پایداری سموم مسی در مدت ۲-۱ هفته نگران‌کننده نمی‌باشد. به هر حال فرمولاسیون و انبارداری مؤثر و بلندمدت اسانس‌ها حائز اهمیت و نیازمند تحقیق بیشتر است.

منابع مورد استفاده

- آل‌یاسین، ک. و بنی‌هاشمی، ض.،۱۳۷۲. جداسازی عامل بیماری سرطان گالی. یازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۱۱-٦ شهریور، ۲۱۵.
- آمارنامه کشاورزی سازمان خواربار جهانی، ۲۰۰٦. رم، ۳٦٦ صفحه. http://www.FAO.com
- امانی، ب.، ۱۳٤٥. سرطان ساقه و ریشه مو. مجله بیماریهای گیاهی، ٤: ۱۸-۱۲.
- ایرانی، ح. و قاسمی، ا.، ۱۳۸۳. *Agrobacterium tumefaceins* biovar 3 عامل سرطان طوقه و ریشه و بررسی جمعیت آن در خاکهای تاکستانهای آذربایجان غربی. شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه تبریز، ۱۱-۷ شهریور، ۳۵۸.
- تفضلی، ع.، حکمتی، ج. و فیروزه، پ.، ۱۳۷۰. انگور. انتشارات دانشگاه شیراز، ۳٤۳ صفحه.
- حسن‌زاده، ن.، ۱۳۷٤. اصول و روشهای باکتری‌شناسی گیاهی. مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ٦٤۱ صفحه.
- جواهری، م.، محمدی، م.، رحیمیان، ح. و شریفی، ع.، ۱۳۷۹. تنوع در مورفولوژی و بیماری‌زایی استرین‌های اگروباکتریم جدا شده از تاکستانهای تهران و قزوین. چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، اصفهان، ۱۷-۱٤ شهریور، ۳٤۲.
- صالحی، س.، قاسمی، ا.، رحیمیان، ح.، امامی، ا. و نوحی، ا.، ۱۳۸۳. جداسازی *Agrobacterium tumefaciens* (***Rhizobium radiobacter***) عامل گال مو در استان قزوین. شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه تبریز، ۱۱-۷ شهریور، ۳۵۷.
- فاتحی پیکانی، ح.، ۱۳۷٦. بررسی سرطان طوقه مو در مناطق کرج و تاکستان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، رشته گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.
- محمودزاده، ح.، ناظمیه، ع.، اسلام مجیدی، ه.، خلیقی، ا. و پیغامی، ا.، ۱۳۸۱. بررسی اثرات تیمارهای حرارتی بر کاهش آلودگی باکتریایی عامل بیماری سرطان طوقه و ریشه در قلمه‌های در حال رکود انگور، ریشه‌زایی و رشد آن در خزانه. پانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه کرمانشاه، ۲۰-۱٦ شهریور، ۲٤۹-۲۵۰.
- Alsup, C.M., 2004. Screening for active ingredients in plant extracts that inhibit the growth of *Agrobacterium tumefaciens*. The Plant Health Instructor, American Phytopathological Society, DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0226-01.
- Burr, T.J., Bazzi, C., Sule, S. and Otten, L., 1998. Crown gall of Grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and developoment of disease control startegies. Plant Disease, 82: 1288-1297.
- Cabrera, C.J., 2003. Can Garlic Prevent Crown Gall? California State Science Fair Project summary, Project number: J 1405, 7p.
- Fahy, P.C. and Persley, G.J., 1983. Plant Bacterial Diseases-A Diagnostic Guide. Academic Press, Australia, 393p.
- Jones, D.A., Ryder, M.H., Clare, B.G., Farrand, S.K. and Kerr, A., 1991. Biological control of crown gall using *Agrobacterium* strains K84 and K1026. 161-170, In: Komada, H., Kiritani, K. and Bay-Petersen, J., (Eds.), The Biological Control of Plant Diseases. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taipei, Taiwan, 215p.
- Kerr, A. and Htay, K., 1974. Biological control of crown gall through bacteriocin production. Physiol Plant Pathol, 4: 37-44.
- Perry, K.L. and Kado, C.I., 1982. Characteristics of Ti plasmids from broad-host- range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains of *Agrobaterium tumefaciens*. The Journal of Bacteriology, 151: 343-350.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third edition, APS Press, 373p.

Antibacterial effects of savory essential oil and two copper compounds in control of grape crown gall

J. Ashrafi[1] and N. Hassanzadeh[2*]

1- Agricultural Research Center and Natural Resources of Ilam Province
2*- Corresponding author, Science and Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran
E-mail: hasanzadehr@yahoo.com

Received: October 2008 Revised: September 2009 Accepted: October 2009

Abstract

During 2005-2006, many grapevine plants and soil samples were collected from Qazvin vineyards for *A. tumefaciens*. All plant samples have been surface sterilized prior culturing on nutrient agar medium (NA). The soil samples have been cultured on semi-selective D1M medium for ease isolation. All suspected colonies were restreaked on NA for pure culture collections. Based on key biochemical and pathogenicity tests, the crown gall bacterial isolates have been identified as *A. tumefaciens*. In order to evaluate the effectiveness of 15 plant essential oils and 2 copper compounds i.e. Bordeaux mixture (0.5%) and copper oxychloride (0.3%) against crown gall bacterium, different laboratory, greenhouse and field trails were conducted. Among these, the essential oil of the plant savory (*Satureia officinalis*) with 9 cm inhibition zones on NA exhibited the most promising antibacterial effect. Similar results were obtained with carrot discs, sunflower seedling assays and also grapevine gall treatments under natural single season field trail. In later case, gall development suppression was doubled compared to two copper compounds. This approach may lead to an alternative control measurement on bacterial crown gall disease management.

Key words: *Agrobacterium tumefaceins*, grape, savory essential oil, control.