DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.107136

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، صفحه ۶۵۴-۶۴۵ (۱۳۹۵)

اثر ضدباکتریایی چند اسانس گیاه دارویی درکنترل باکتری‌های عامل پوسیدگی و پژمردگی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

لیلی علمشاهی[1*] و مرضیه حسینی‌نژاد[2]

۱*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه زابل، ایران، پست الکترونیک: alamshahi.4600@gmail.com

۲- استادیار، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۴

چکیده

امروزه استفاده از اسانس‌های گیاهی برای دستیابی به مواد ضدباکتریایی طبیعی برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. در این تحقیق اثر بازدارندگی اسانس پنج گیاه آویشن باغی (*Thymus sativum* L.)، گشنیز (*Coriandrum sativum* L.)، زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و اکالیپتوس (*Eucalyptus globules* L.) با روش تقطیر با آب استخراج و اثر بازدارندگی آنها بر روی باکتری‌های *Ralstonia solanacearu* (عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی) و *Pectobacterium carotovorum* (عامل پژمردگی سیب‌زمینی) با روش دیسک دیفیوژن آزمایش شد. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی از روش رقت لوله‌ای استفاده شد. آزمایش‌ها در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی تجزیه واریانس گردید. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (نرم‌افزار MSTAT-C) انجام شد. در مرحله گلخانه‌ای از اسانس آویشن باغی که بیشترین مقدار بازدارندگی را بر روی هر دو باکتری در مرحله آزمایشگاهی نشان داده بود، استفاده گردید. نتایج نشان داد که اسانس آویشن باغی با ایجاد هاله بازدارندگی به قطر ۳۴/۸ میلی‌متر در مقایسه با سایر اسانس‌ها دارای بیشترین اثر و فعالیت ضدباکتریایی بود. برای آزمایش‌های گلخانه‌ای از اسانس آویشن با غلظت‌های ۰/۵٪ به روش اسپری و ۱٪ به روش ریختن اسانس به خاک استفاده شد. نتایج نشان داد که آویشن باغی به میزان ۴۱٪ وقوع بیماری پوسیدگی نرم و ۴۴٪ وقوع پژمردگی باکتریایی را در سیب‌زمینی کاهش داد. بنابراین اسانس آویشن باغی می‌تواند با داشتن قابلیت ضدباکتریایی مناسب، به‌عنوان عامل بازدارنده در مدیریت این دو بیماری در گیاه سیب‌زمینی بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، اسانس گیاهی، *Ralstonia solanacearum*، *Pectobacterium carotovorum*.

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های مدرن در بهداشت انسانی و تکنیک‌های تولید غذا، سلامت مواد غذایی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (WHO, 2002). تخمین زده می‌شود که هر ساله بیش از ۳۰٪ مردم در کشورهای صنعتی از آلودگی‌های غذایی رنج می‌برند (WHO, 2002). بنابراین نیاز به روش‌های جدید در تلفیق با روش‌های موجود برای کاهش یا حذف عوامل بیماری‌زای غذایی احساس می‌شود (Leistner, 1978). در همین راستا، جوامع به سوی مصرف سبز (کاهش افزودنی‌های غذایی مصنوعی با زیان کمتر برای

محیط زیست) تلاش می‌کنند (Smid & Gorris, 1999؛ Tuley de Silva, 1995) برای کاهش خطرات تهدیدکننده سلامت انسان و ضررهای اقتصادی که توسط میکروب‌های آلوده‌کننده غذا ایجاد می‌شوند، استفاده از تولیدات طبیعی به‌عنوان ترکیب‌های ضدباکتریایی توصیه می‌شود (Conner, 1993؛ Daferera *et al*., 2000) که راه‌حل مناسبی برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و افزایش زمان انقضاء فرآورده‌های غذایی است (Oussalah *et al*., 2006).

اسانس‌های گیاهی به‌عنوان افزودنی‌های ضدباکتریایی طبیعی گزینه مناسبی به نظر می‌رسند، به‌طوری که خواص ضدباکتریایی بسیاری از اسانس‌ها و ترکیب‌های آنها به اثبات رسیده است (Mari *et al*., 2003). اسانس‌های گیاهی، به‌ویژه گیاهان دارویی و اجزاء تشکیل‌دهنده برای داشتن فعالیت ضدباکتریایی بر روی طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های گرم منفی (Helander, 1998؛ Sivropoulou *et al*., 1996) و گرم مثبت (Kim *et al*., 1995) شناخته شده‌اند. این‌طور نشان داده شده‌است که باکتری‌های گرم منفی در مقابل اثر آنتاگونیستی اسانس‌ها، معمولاً مقاومتر از باکتری‌های گرم مثبت هستند و این به‌دلیل وجود لیپو پلی‌ساکارید در غشاء بیرونی سلول باکتری می‌باشد اما این نتیجه همیشه درست نبوده است (Burt, 2004؛ Karapinar & Aktug, 1987).

در گذشته خاصیت ضدباکتریایی اسانس برخی گیاهان بر روی باکتری‌ها آزمایش شده‌اند. در تحقیقی نشان داده شده که اسانس گشنیز از رشد باکتری‌های *Staphyllococcus aureus*، *Escherichia coli* و*Salmonella typhimuruim* جلوگیری کرده‌است (Broomand *et al*., 2008). همچنین خواص باکتری‌کشی اسانس آویشن باغی روی باکتری آتشک درختان دانه‌دار اثبات شده‌است (Hasanzadeh *et al*., 2005). Gachkar و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که اسانس زیره سبز از رشد باکتری‌های *Escherichia coli*، *Listeria monositogenes* و *Salmonella aureuse* جلوگیری می‌کند. براساس مطالعه Romano و همکاران (۲۰۰۸) اسانس رزماری از رشد *Escherichia coli* و *Salmonella aureus* جلوگیری می‌کند.

از بیماری‌های خطرناک سیب‌زمینی، بیماری پوسیدگی نرم و پژمردگی باکتریایی می‌باشند که به‌ترتیب توسط باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum* و *Ralstonia solanacearum* ایجاد می‌شوند. این بیماری‌ها کیفیت و کمّیت محصول را به‌شدت کاهش می‌دهند. این دو بیماری از مهمترین بیماری‌های غده، قطعات بذری و بوته‌های سیب‌زمینی می‌باشند و به‌راحتی از طریق کشت غده‌های آلوده منتقل می‌شوند (Murray *et al*., 1995).

در این تحقیق، اسانس‌های گیاهی استخراج شده از *Thymus sativum*، *Cuminum cyminum*، *Rosmarinus officinalis*، *Coriandrum sativum* و *Eucalyptus globulus* بر روی باکتری‌های *P. carotovorum* و *R. solanacearum* در آزمایشگاه و گلخانه آزمایش شدند تا میزان اثر ضدباکتریایی این اسانس‌ها بر روی دو باکتری سنجیده شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و استخراج اسانس از آنها

برگ آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و اکالیپتوس (*Eucalyptus globules* L.) از پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل، بذر گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) و زیره سبز (*Cominum cyminum* L.) از مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی جمع‌آوری شد و بعد به مدت یک هفته در سایه و در دمای اتاق خشک گردید.

تهیه باکتری‌ها

باکتری‌های *R. solanacearum* و *P. carotovorum* از دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه شد.

آزمون بازدارندگی از رشد

ابتدا باکتری‌های *R. solanacearum* و *P. carotovorum* در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت در آزمایش استفاده شد. برای آزمون بازدارندگی از

رشد از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد (Murray *et al.*, 1995). پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (برای *E. coli*) و سوکروز پپتون آگار (برای *R. solanacearum*) را آماده کرده و در هر پلیت، توسط سمپلر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^8 سی‌اف‌یو بر میلی‌لیتر باکتری ریخته شد و خشک شد. کاغذ صافی (Sartorius) توسط پانچ در قطعات ۶ میلی‌متری تهیه و در اتوکلاو استریل گردید. اسانس *T. vulgaris* در اتانول ۹۹/۶٪ در رقّت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪ تهیه شد. هر دیسک کاغذی به مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر رقّت آغشته شده و پس از خشک شدن در وسط پلیت حاوی باکتری قرار داده شد. از حلال اتانول به‌عنوان شاهد منفی و از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین (۱۵µg/disc) و استرپتومایسین (۱۰µg/disc) به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. در تیمار شاهد منفی ۱۰ میکرولیتر حلال اتانول ۹۹/۶٪ به دیسک کاغذی اضافه شد. نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت قطر هاله بازدارندگی با خط‌کش براساس میلی‌متر یادداشت شد.

تعیین کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت باکتری‌کشی

برای این منظور از روش رقّت لوله‌ای استفاده شد (Kivanc & Akgul, 1986). در این روش در لوله‌های آزمایش محتوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث باکتری‌های *E. coli*، *R. solanacearum* و *P. carotovorum* به‌طور جداگانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت از سوسپانسیون 10^8 سی‌اف‌یو بر میلی‌لیتر هر باکتری مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقّت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱٪ اسانس در حلال اتانول ۹۹/۶٪ اضافه شد. نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بعد از ۴۸ ساعت تیمارها مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند و کمترین غلظتی که هیچ‌گونه اثر بازدارندگی قابل مشاهده بر باکتری نداشت به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در نظر گرفته شد. در تیمار شاهد مقدار ۵۰ میلی‌لیتر حلال اتانول ۹۹/۶٪ بکار برده شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

غده‌های سیب‌زمینی رقم Fontane حاوی جوانه‌های آماده کشت از منطقه جلگه رخ استان خراسان رضوی تهیه شد. مخلوط شن، خاک رس و خاک‌برگ با نسبت‌های ۱:۱:۱ تهیه و توسط دستگاه اتوکلاو به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد سترون شد (Irikiin *et al.*, 2006). در هر گلدان یک غده جوانه‌دار سیب‌زمینی کاشته و در گلخانه در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰٪ نگهداری شد. هر هفت روز یک‌بار بوته‌ها با کود گرانوله ازت، فسفات و پتاسیم به نسبت ۳ در هزار و کلات آهن به نسبت ۲ در هزار به‌صورت محلول‌پاشی تیمار شدند.

در مرحله گلخانه‌ای از اسانس آویشن باغی که بیشترین مقدار بازدارندگی را بر روی هر دو باکتری در مرحله آزمایشگاهی نشان داده بود، استفاده گردید. برای این منظور، پس از دو ماه از کشت گیاه سیب‌زمینی، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر اسانس آویشن باغی با غلظت ۱٪ با نسبت ۱: ۱: ۱۰۰ (اسانس: الکل: آب) تهیه گردید و در خاک هر گلدان ریخته شد. از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های *P. carotovorum* و *R. solanacearum* براساس روش Kempe و Sequeira (۱۹۸۳) برای تلقیح ساقه و ریشه بوته استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از اعمال اسانس در هر گلدان، با استفاده از سرنگ انسولین مقدار ۲۰ مایکرولیتر از سوسپانسیون 10^8 سی‌اف‌یو بر میلی‌لیتر باکتری در محل زاویه برگ و ساقه تزریق شد. در آلوده‌سازی ریشه گیاه، ابتدا ریشه‌ها با چاقوی سترون کمی خراش داده شد و بعد مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون 10^8 سی‌اف‌یو بر میلی‌لیتر باکتری در خاک ریخته شد. ۴۸ ساعت بعد برای محلول‌پاشی اسانس آویشن باغی بر روی گیاه، غلظت ۰/۵٪ اسانس با نسبت ۰/۵: ۰/۵: ۱۰۰ (اسانس: الکل: آب) تهیه گردید و بر روی شاخ و برگ گیاه اسپری گردید. این

آزمایش‌ها شامل چهار تیمار، گیاه آلوده به باکتری، گیاه آلوده به باکتری و آغشته به اسانس، گیاه کاملاً سالم و گیاه کاملاً سالم و اعمال اسانس مورد آزمایش قرار گرفتند. بیست روز پس از مایه‌زنی یادداشت‌برداری از بوته‌ها انجام شد. شاخص بیماری پژمردگی باکتریایی براساس روش Kempe و Sequeira (۱۹۸۳) بر طبق مقیاس ۴-۱ به‌صورت زیر اندازه‌گیری شد:

شاخص صفر: بدون علائم، ۱: ۲۵-۱٪ پژمردگی شاخ و برگ، ۲: ۵۰-۲۶٪ پژمردگی شاخ و برگ، ۳: ۷۵-۵۱٪ پژمردگی شاخ و برگ و ۴: ۱۰۰-۷۶٪ پژمردگی شاخ و برگ.

شاخص بیماری پوسیدگی نرم بر طبق مقیاس ۸-۱ اندازه‌گیری شد. نمره صفر برای گیاهچه‌هایی که فاقد علائم زردی، پژمردگی، سیاه شدن و پوسیدگی ساقه بودند و نمره ۸ برای گیاهچه‌هایی که به‌طور کامل از بین رفته بودند، منظور شد (Bagheri & Zafari, 2005).

تعیین وقوع بیماری، کارایی کنترل بیولوژیک و افزایش بیوماس

وقوع بیماری با شمارش تعداد بوته‌های بیمار نسبت به تعداد کل بوته‌های هر تیمار محاسبه شد.

کارایی کنترل بیولوژیک و افزایش بیوماس وزن تر براساس روش Xue و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

۱۰۰ × [میانگین وزن تر شاهد/(میانگین وزن تر شاهد – میانگین وزن تر تیمار)] = افزایش بیوماس

۱۰۰ × [بیماری شاهد/(بیماری تیمار – بیماری شاهد)] = کارایی کنترل بیولوژیک

تجزیه و تحلیل نتایج

آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در سه تکرار انجام شدند و در هر تکرار سه نمونه از هر تیمار گذاشته شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شد و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید.

نتایج

نتایج آزمایشگاهی

هر پنج اسانس گیاهی تأثیرات ضدباکتریایی را بر روی باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند. اندازه هاله بازدارندگی با توجه به غلظت و نوع اسانس گیاهی متفاوت بود. به‌طوری که غلظت ۱۰۰٪ اسانس آویشن با ایجاد قطر هاله بازدارندگی ۳۴/۸ میلی‌متر در باکتری *R. solanacearum* بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را نشان داد که بیشتر از هاله اندازه‌گیری شده در نمونه استرپتومایسین (۲۲ میلی‌متر) می‌باشد (جدول ۱).

رزماری پس از آویشن بیشترین تأثیر ضدباکتریایی را بر روی هر دو باکتری *R. solanacearum* و *P. carotovorum* داشت (در هر دو ۱۱/۸میلی‌متر) (جدول‌های ۱ و ۲). کنترل منفی هیچ‌گونه فعالیت باکتری‌کشی بر روی هیچ‌یک از باکتری‌های بیماری‌زا نداشت. در نتایج بدست‌آمده از آزمایشگاه مشخص شد که باکتری *R. solanacearum* نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین مقاوم می‌باشد. البته تأثیر باکتری‌کشی اسانس‌ها با غلظت آنها رابطه مستقیم داشت. به‌طوری که مقدارهای بالاتر هاله بازدارندگی در غلظت های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪ اندازه‌گیری شد. کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) و کمترین غلظت باکتری‌کشی (MBC) در اسانس های مختلف از ۱ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر متفاوت بود. به‌طوری که کمترین غلظت بازدارندگی از رشد باکتری های مورد آزمایش مربوط به اسانس آویشن بود که بر روی باکتری *R. solanacearum* مقدار ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و باکتری‌های *E. coli* و *P. carotovorum* مقدار ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج گلخانه‌ای

نتایج کنترل بیولوژیک اسانس آویشن بر روی بیماری‌های پژمردگی باکتریایی و پوسیدگی نرم در گلخانه در جدول‌های ۳، ۴ و ۵ آورده شده است. به‌طور کلی کاهش چشمگیری در وقوع بیماری‌های پژمردگی و پوسیدگی نرم و افزایش وزن ساقه و ریشه گیاه سیب‌زمینی وجود داشت. وزن ساقه و ریشه کنترل منفی و گیاه سالم تیمار شده با اسانس تغییر نکرد. در این آزمایش کنترل مثبت بیش از ۸۰٪ علائم پژمردگی و پوسیدگی نرم نشان داد. در حالی‌که هیچ‌یک از تیمارهای کنترل منفی علائم بیماری نشان ندادند. علاوه‌بر این هیچ‌گونه نشانه غیرعادی بر روی برگ یا ریشه گیاه سالم تیمار شده با اسانس مشاهده نشد. براساس جدول ۳ وقوع بیماری در گیاه آلوده به باکتری *P. carotovorum* و تیمار شده با اسانس آویشن ۴۰/۶۷٪ در مقایسه با کنترل مثبت بود (۸۲/۳۳٪). با تیمار خاک گیاه سیب‌زمینی وزن خشک و تر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0.05$)، به‌طوری که وزن تر ریشه ۲۸/۳۰ گرم و وزن خشک ساقه ۱/۹۵ گرم در مقایسه با کنترل مثبت بود (به‌ترتیب ۱۹/۷۸ و ۱/۳۳ گرم) (جدول ۳).

نتایج وزن خشک و تر گیاه آلوده به باکتری *R. solanacearum* با کنترل مثبت تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۴). همچنین وزن خشک و تر ریشه و ساقه کنترل مثبت آلوده به بیماری پژمردگی باکتریایی بسیار کاهش یافت. وقوع بیماری در تیمار آلوده به باکتری *R. solanacearum* ۳۶/۶۷٪ بود که به‌طور معنی‌داری از کنترل مثبت (۸۰/۶۷) کمتر بود (جدول ۴).

همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده‌است، بیشترین مقدار کنترل بیماری توسط اسانس آویشن در گیاه آلوده به *R. solanacearum* به میزان ۵۳/۸۵٪ بوده‌است، در حالی‌که اعمال اسانس در گیاه آلوده به باکتری *P. carotovorum* توانسته ۵۰/۲٪ پوسیدگی نرم را کنترل کند. بیوماس ریشه و شاخه سیب‌زمینی‌های آلوده با باکتری *R. solanacearum* ۲۳/۲۵٪ و *P. carotovorum* ۲۲/۳۰٪ افزایش نشان داد (جدول ۵).

جدول ۱- اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس‌های مورد آزمایش بر باکتری *R. solanacearum*

اسانس	غلظت (٪)											
	۰	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۰/۵	۱	۵	۱۰	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰
گشنیز	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۶/۶ l	۷/۱ k	۷/۸ j	۹/۱ h
زیره سبز	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۶/۵ l	۷/۱ k	۸ j	۹ h	۹/۶ g
آویشن باغی	۰ m	۰ m	۰ m	۶/۵ l	۷/۸ j	۱۱/۸ e	۱۰ if	۱۱/۸ e	۱۳/۱ d	۲۲/۸ c	۲۹/۶ b	۳۴/۸ a
رزماری	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۶/۵ l	۸ j	۸/۸ hi	۱۱/۸ e
اکالیپتوس	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۰ m	۶/۵ l

اندازه هاله بازدارندگی شامل قطر دیسک کاغذی می‌باشد (۶ میلی‌متر).

در هر ستون حروف غیرمشابه با آزمون دانکن در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

غلظت صفر مربوط به تیمار با اتانول می‌باشد (کنترل منفی).

مقادیر هاله بازدارندگی بر حسب میلی‌متر می‌باشند.

جدول ۲- اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس‌های مورد آزمایش بر باکتری *P. carotovorum*

اسانس	غلظت (٪)										
	۰	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱	۰/۵	۱	۵	۱۰	۲۵	۵۰	۷۵	۱۰۰
گشنیز	۰ n	۰n	۰ n	۰ n	۰ n	۰ n	۸ hi	۹/۱ g	۱۰ f	۱۰ f	۱۰/۶ e	۱۱/۱۷ d
زیره سبز	۰ n	۰n	۰ n	۰ n	۰ n	۰ n	۰ n	۶/۶ m	۷/۱ kl	۷/۱ kl	jk۷/۵	۷/۵ jk
آویشن باغی	۰ n	۰ n	۰ n	۰ n	۷/۱ kl	۷/۶ ij	۱۰/۵ g	۱۰/۵ e	۱۴ c	۱۵/۶ b	۱۶ b	۱۶/۵ a
رزماری	۰ n	۰ n	۰ n	۰ n	۰n	۰n	۰ n	۰ n	۶/۶ m	۷/۱ kl	۷/۱ kl	۸/۱ h
اکالیپتوس	۰ n	۰ n	۰ n	۰ n	۰n	۰n	۰ n	۰ n	۰ n	۰ n	۶/۸ lm	۷/۶ ij

اندازه هاله بازدارندگی شامل قطر دیسک کاغذی می‌باشد (۶ میلی‌متر).

در هر ستون حروف غیرمشابه با آزمون دانکن در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

غلظت صفر مربوط به تیمار با اتانول می‌باشد (کنترل منفی).

مقادیر هاله بازدارندگی بر حسب میلی‌متر می‌باشند.

جدول ۳- درصد بیماری‌زایی باکتری *P. carotovorum* در گیاه سیب‌زمینی تیمار شده با اسانس آویشن در گلخانه

تیمار	وقوع بیماری (٪)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر ساقه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن خشک ساقه (گرم)
کنترل مثبت[1]	۸۲/۳۳ a	۱۹/۷۸ b	۱۲/۸۴ b	۱/۱۸ b	۱/۳۳ b
گیاه آلوده به باکتری تیمار شده با اسانس	۴۰/۶۷ b	۲۴/۳۰ ab	۱۵/۵۱ b	۱/۵۰ b	۱/۹۵ ab
گیاه سالم تیمار شده با اسانس	۰ c	۳۲/۰۸ a	۱۸/۹۸ a	۱/۹۷ a	۲/۱۴ a
کنترل منفی (گیاه سالم)	۰ c	۳۲/۰۹ a	۱۸/۴۷ a	۱/۹۱ a	۲/۰۱ a

۱- گیاه آلوده به باکتری و تیمار نشده با اسانس

در هر ستون حروف غیرمشابه با آزمون دانکن در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۴- درصد بیماری‌زایی باکتری *R. solanacearum* در گیاه سیب‌زمینی تیمار شده با اسانس آویشن در گلخانه

تیمار	وقوع بیماری (٪)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر ساقه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن خشک ساقه (گرم)
کنترل مثبت[1]	۸۰/۶۷ a	۱۴/۴۷ c	۱۲/۷۹ c	۱/۳۱ c	۱/۸۴ b
گیاه آلوده به باکتری تیمار شده با اسانس	۳۶/۶۷ b	۱۸/۸۸ b	۱۶/۵۵ b	۲/۶۱ b	۲/۶۹ a
گیاه سالم تیمار شده با اسانس	۰ c	۲۲/۸۲ b	۲۳/۵۵ a	۳/۰ a	۳/۲۶ a
کنترل منفی (گیاه سالم)	۰ c	۲۳/۰۸ a	۲۳/۳۲ a	۳/۰۸ a	۳/۲۵ a

۱- گیاه آلوده به باکتری و تیمار نشده با اسانس

در هر ستون حروف غیرمشابه با آزمون دانکن در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۵- کارایی بیوکنترل و افزایش بیوماس ریشه و شاخه

بیماری	کارایی کنترل بیولوژیک (٪)	افزایش بیوماس ریشه (٪)	افزایش بیوماس شاخه (٪)
پوسیدگی نرم	۵۰/۲ a	۱۸/۵۵ b	۱۷/۳۳ b
پژمردگی باکتریایی	۵۳/۸۵ a	۲۳/۲۵ b	۲۲/۳۰ b

در هر ستون حروف غیرمشابه با آزمون دانکن در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

بحث

در بین پنج اسانس گیاه دارویی مورد استفاده در این تحقیق اسانس آویشن بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را بر روی باکتری‌های مورد آزمایش در آزمایشگاه و گلخانه نشان داد. تاکنون گزارشات متعددی در مورد خواص ضدباکتریایی اسانس آویشن وجود داشته است (Bhaskara *et al*., 1998). در گلخانه خاصیت آنتی‌باکتریال آویشن بر روی باکتری *Xanthomonas citri* pv. *citri* ۶۹٪ گزارش شده‌است (Samavi *et al*., 2009). همچنین Lucas و همکاران (۲۰۱۲) کاهش بیماری ناشی از باکتری *Xanthomonas vesicatoria* در نتیجه استفاده از غلظت ۰/۱٪ آویشن را مشاهده کردند. اخیراً محققان زیادی اسانس‌های گیاهی متفاوت را بر روی *R. solanacearum* و *P. carotovorum* انجام دادند و به این ترتیب اهمیت مسأله را نشان دادند. Jeong و همکاران (۲۰۰۹) اسانس گیاه *Cymbopogon* sp. را در غلظت ۰/۵٪ بر روی رشد باکتری *P. carotovorum* آزمایش کرد و بازدارندگی کامل از رشد باکتری را مشاهده نمود. Vukovic و همکاران (۲۰۰۷) ثابت کردند که *Teucrium* sp. دارای تأثیرات باکتری‌کشی بر باکتری *P. carotovorum* می‌باشد. علاوه‌بر این، Biavati و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت ضدباکتریایی *Satureja* sp. و *Thymbra* sp. را بر روی باکتری *P. carotovorum* نشان دادند. در تحقیقی دیگر، Vokou و همکاران (۱۹۹۳) تأثیرات باکتری‌کشی رزماری را بر ضد *P. carotovorum* اثبات کردند. Ji و همکاران (۲۰۰۵) تیمول را در شرایط مزرعه بر روی *R. solanacearum* آزمایش و جلوگیری از بیماری پژمردگی را در گیاهان مشاهده کردند.

گشنیز پس از آویشن باغی دارای اثرات ضدباکتریایی مناسبی بر هر سه باکتری بود. گشنیز فاقد ترکیب‌های فنلی است، ولی به میزان ۷۰-۶۰٪ حاوی لینالول می‌باشد. Wan و همکاران (۱۹۹۸) در بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس ریحان دریافتند که خاصیت باکتری‌کشی این اسانس به‌طور عمده مربوط به وجود لینالول می‌باشد (Wan *et al*., 1998).

اسانس رزماری فاقد ترکیب‌های ضدباکتریایی فنله می‌باشد. در تحقیق Daferera و همکاران (۲۰۰۲) اسانس رزماری در مقایسه با اسانس آویشن باغی اثرات ضدباکتریایی بسیار ضعیفی بر روی عوامل بیماری‌زای *Fusarium* sp.، *Botrytis cinerea* و *Clavibacter michiganensis* sp. *michiganensis* داشت.

نشان داده شده که اثرات ضدباکتریایی آویشن به‌دلیل وجود ترکیب‌های فنلی به‌ویژه تیمول می‌باشد. فنل‌های ترپنی با گروه‌های آمین و هیدروکسیل آمین غشاء باکتری‌ها پیوند شده و با تخریب ساختار دیواره و رهاسازی لیپیدها به داخل سیتوپلاسم سبب نفوذپذیری بیشتر سلول باکتری و مرگ آن می‌شوند (Juven *et al*., 1994). بیش از ۶۰ جزء در اسانس *T. vulgaris* که اغلب دارای خواص آنتی‌اکسیدان و آنتی‌باکتریال می‌باشند شناسایی شده‌اند (Baranauskiene *et al*., 2003). مهمترین ترکیب‌ها در این اسانس، تیمول (۶۰-۴۴٪) و کارواکرول (۲/۴-۲/۲٪) می‌باشد که به‌ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت ضدباکتریایی را دارند (Bounatoriro *et al*., 2007). بنابراین به نظر می‌رسد ترکیب‌های جزئی موجود در اسانس آویشن نقش سینرژیستی در فعالیت ضدباکتریایی ایفاء می‌کنند (Bounatoriro *et al*., 2007).

در این تحقیق در مطالعات گلخانه کاهش چشمگیر وقوع هر دو بیماری پژمردگی و پوسیدگی نرم در نتیجه فعالیت اسانس آویشن در گیاه سیب‌زمینی مشاهده شد. ترکیب‌های اجزای اسانس در طی ۴۸ ساعت در خاک در مجاورت ریشه، ممکن است سبب القای مقاومت سیستمیک در گیاه شده باشد که در نتیجه وقوع بیماری را کاهش داده‌است. ثابت شده‌است که گیاهان دارای مکانیسم‌های دفاعی در مقابل حمله عوامل بیماری‌زا هستند و برخی از این مکانیسم‌ها توسط مواد زنده یا غیرزنده القاء می‌شوند. مقاومت القاء شده با مشاهده محدودیت یا توقف رشد علائم بیماری تشخیص داده شده‌است (Walters *et al*., 2005). همچنین این امکان وجود دارد که اسانس آویشن تأثیر باکتری‌کشی در خاک داشته و سبب از بین رفتن درصدی از باکتری‌های مورد آزمون در خاک شده‌است.

نتایج مرحله آزمایشگاهی و گلخانه‌ای این تحقیق حکایت از آن دارد که اسانس آویشن دارای قابلیت بسیار بالای ضدباکتریایی بوده و می‌تواند در کنترل تلفیقی در کنار سایر روش‌های غیرشیمیایی بر ضد بیماری‌های پژمردگی باکتریایی و پوسیدگی نرم سیب‌زمینی استفاده گردد. اگرچه تحقیقات مزرعه‌ای نیاز است تا مؤثر بودن کاربرد اسانس را در شرایط طبیعی تأیید کند و غلظت مصرف اسانس را برای حصول کنترل قابل قبول بیماری و صرفه اقتصادی بدست آورد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و صنایع غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Bagheri, A. and Zafari, D., 2005. Evaluation and identification of potato varieties resistance to black leg (soft rot) disease. Agricultural Research (Water, Soil and Plant in Agriculture), 5(2): 17-26.
- Baranauskiene, S.P., Venskutoni, R., Viskelis, P. and Dambrauskiene, E., 2003. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51:7751-7758.
- Bhaskara, M.V., Angers, P., Gosselin, A. and Arul, J., 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry, 47:1515-1520.
- Biavati, B., Ozcan, M. and Piccaglia, R., 2004. Composition and antimicrobial properties of *Satureja cuneifolia* and *Thymbra sintenisii* Bornm. et Aznav. subsp. *isaurica* P.H. Davis essential oils. Annals of Microbiology, 54(4): 393-401.
- Bounatoriro, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. and Pedro, L.G., 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Journal of Food Chemistry, 105: 146-155.
- Broomand, A., Hamedi, M., Emamjomeh, Z., Razavi, S.H. and Golmakani, M.T., 2008. Investigation on the antimicrobial effects of essential oils from dill and coriander seeds on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella typhimuruim*. Journal of Agricultural Sciences, 4(1): 59-68.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- Conner, D.E., 1993. Naturally occurring compounds: 441-468. In: Davidson, P., Sofos, J.N. and Branen, A.L., (Eds.). Antimicrobials in Foods. Marcel Dekker, Inc., New York, 706p.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and Polissiou, M.G., 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48(6): 2576-2581.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and Polissiou, M.G., 2002. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 22: 39-44.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Alipoor Astaneh, S. and Rasooli, I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry, 102: 898–904.
- Hasanzadeh, N., 2005. Technological implication of natural products in plant diseases management with

- Mari, M., Bertolini, P. and Pratella, G.C., 2003. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. Journal of Applied Microbiology, 94: 761-766.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Yolke, R.H., 1995. Manual of Clinical Microbiology. Washington, DC: ASM, 1482p.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M., 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a Pseudomonas putida strain isolated from meat. Meat Science, 18: 414-420.
- Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. and Moreno, S., 2008. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chemistry, 15: 456-461.
- Samavi, S., Hassanzadeh, M., Faghihi, M. and Rezaee, Y., 2009. Journal of Plant Pathology, 91(3): 691-696.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C. and Kokkini, S., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1202-1205.
- Smid, E.J. and Gorris, L.G.M., 1999. Natural antimicrobials for food preservation: 285-308. In: Rahman, M.S., (Ed.). Handbook of Food Preservation. Marcel Dekker, New York, 1088p.
- Tuley de Silva, K., 1995. A Manual on the Essential Oil Industry. United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), Vienna, 231p.
- Vokou, D., Vareltzidou, D. and Katinakis, P., 1993. Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. Agriculture, Ecosystems and Environment, 47: 223-235.
- Vukovic, T., Milosevic, S., Sukdolak, S. and Solujic, S., 2007. Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 4: 17-20.
- Walters, D.R., Walsh, D., Newton, A.C. and Lyon, G.D., 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. Phytopathology, 95: 1368-1373.
- Wan, J., Wilcock, A. and Coventry, M.J., 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens. Journal Applied Microbiology, 84: 152-158.
- WHO., 2002. Food safety and foodborne illness. World Health Organization Fact sheet 237, revised January Geneva.
- Xue, Q.Y., Chen, Y., Li, S.M., Chen, L.F., Ding, G.C., Guo, D.W. and Guo, J.H., 2008. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against Ralstonia wilt of tomato. Biological Control, 48: 252-258.

special emphasis on fireblight. Journal of Agricultural Sciences, 1: 53-68.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:3590-3595.
- Irikiin, Y., Nishiyama, M., Otsuka, S. and Senoo, K., 2006. Rhizobacterial community-level, sole carbon source utilization pattern affects the delay in the bacterial wilt of tomato grown in rhizobacterial community model system. Applied Soil Ecology, 34: 27–32.
- Jeong, M.R., Park, P.B., Kim, D.H., Jang, Y.S., Jeong, H.S. and Choi, S.H., 2009. Essential oil prepared from *Cymbopogon citrates* exerted an antimicrobial activity against plant pathogenic and medical microorganisms. Microbiology, 37: 48-52.
- Ji, P., Momol, M.T., Olson, S.M., Pradhanang, P.M. and Jones, J.B., 2005. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Disease, 89: 497-500.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriolog, 76: 626-631.
- Karapinar, M. and Aktug, S.E., 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. International Journal of Food Microbiology, 4: 161-166.
- Kempe, J. and Sequeira, L., 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant Disease, 67: 499-503.
- Kim, J., Marshall, M.R. and Wei, C.I., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 2839-2845.
- Kivanc, M. and Akgul, A., 1986. Antibacterial activities of essential oils from Turkish species and citrus. Flavour and Fragrance Journal, 1: 175-179.
- Leistner, L., 1978. Hurdle effect and energy saving: 553-557. In: Downey, W.K., (Ed.). Food Quality and Nutrition. Applied Science Publishers, London, England, 712p.
- Lucas, G.C., Alves, E., Pereira, R.B., Perina, F.G. and Souza, R.M., 2012. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. Brazilian Agricultural Research, 47: 351-359.

Inhibitory effects of essential oils of some medicinal plants on the causal agents bacteria of potato wilt and soft rot under laboratory and greenhouse conditions

L. Alamshahi[1*] and M. Hosseini Nezhad[2]

1*- Corresponding author, M.Sc. in Plant Diseases, College of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran
E-mail: alamshahi.4600@gmail.com
2- Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

April: May 2015 Revised: September 2015 Accepted: September 2015

Abstract

Nowadays, using essential oils as natural antibacterial inhibitors to control of plant diseases has been widely investigated. In the current research, the essential oils of *Coriandrum sativum* L., *Thymus sativum* L., *Cuminum cyminum* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Eucalyptus globulus* L. were extracted by water distillation method and then the inhibitory effects were tested against *Pectobacterium carotovorum* (causal agent of bacterial wilt in potato) and *Ralstonia solanacearum* (causal agent of soft rot in potato) using paper disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were determined by twofold broth dilution method. The experiments were analyzed by a completely randomized factorial design. Duncan's multiple range test (MSTATC software) was used for comparison of means. Thyme oil exhibited the highest antibacterial activity in cultured media for both plant pathogenic bacteria, so it was selected to be applied in greenhouse experiments. The results showed that *T. vulgaris* had the most inhibition zone compared to the other oils in cultured media with 34.8 mm. In the greenhouse experiments, thyme oil was used for plant spraying and soil drenching methods at concentration of 0.5 and %1, respectively. According to the results, the thyme essential oil caused a significant reduction in soft rot and bacterial wilt incidence on potato by 41 and 44%, respectively compared with the control sample. Generally, thyme oil with a suitable antibacterial potential would be considered as an inhibitory agent to management of two studied diseases on potatoes.

Keywords: Antibacterial effects, essential oils, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum*.