



## اثر اسانس‌های مختلف گیاهی بر روی *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* به عنوان آفت خیار

فرید عمیدی فضلی\*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد صوفیان، گروه علوم و صنایع غذایی، صوفیان، ایران

فریبا رجبی

دانشگاه تبریز، گروه گیاه‌پزشکی، تبریز، ایران

غلام خداکرمیان

دانشگاه تبریز، گروه گیاه‌پزشکی، تبریز، ایران

اسداله بابای اهری

دانشگاه تبریز، گروه گیاه‌پزشکی، تبریز، ایران

محل انجام پژوهش: گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۵

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۴

### چکیده

خیار از گیاهانی است که مصرف خوراکی بالایی دارد، ولی سالانه، خسارت فراوانی بر اثر تهاجم بیمارگر عامل لکه زاویه‌ای در مزارع و گلخانه‌ها به آن وارد می‌شود. رایج‌ترین روش کنترل این آفت، استفاده از باکتری کش‌ها است که گاهی حین فراوری نیز حذف نشده و با محصول نهایی وارد بدن مصرف‌کننده می‌شود. در این پژوهش، به منظور یافتن روش‌های همگام با طبیعت و کم‌خطر در مدیریت این بیماری، از اسانس گیاهان دارویی استفاده شد. دوازده گیاه (بومادران، شوید، دارچین، زیره سبز، اکالیپتوس، میخک، رازیانه، نعنای فلفلی، نعنای مرزه، آویشن و زنجبیل) متعلق به هفت خانواده گیاهی، جمع‌آوری گردید. اسانس‌ها پس از خشک و پودر نمودن گیاهان، با روش تقطیر با آب، تهیه شدند. در بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌ها، از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها (با غلظت حدود  $10^9-10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>) بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار استفاده گردید. در هر پتری، سه دیسک آغشته به یک اسانس معین و یک دیسک شاهد قرار داده شد. پس از طی دوره انکوباسیون، قطر هاله‌های بازداشته از رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری گردید. داده‌های حاصل، در سه تکرار بر پایه طرح کاملاً تصادفی، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. طبق نتایج، اسانس‌های مرزه، میخک و آویشن، از اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به سایر موارد روی رشد باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* در آزمایشگاه برخوردار بودند. در این راستا اسانس‌های اکالیپتوس، رازیانه و زنجبیل، دارای اثرات بازدارندگی کم بودند.

واژه‌های کلیدی: اسانس، پاتوژن‌های باکتریایی، آفت خیار، پseudوموناس

## مقدمه

عامل لکه زاویه‌ای خیار در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است.

باکتری *P. syringae pv. lachrymans* عامل بیماری لکه زاویه‌ای برگ‌گی و لکه‌دار شدن میوه کدوپیان است. بیماری، دارای انتشار وسیع بوده و به ویژه بعد از باران‌های فراوان و در دماهای بین  $23^{\circ}\text{C}$  تا  $28^{\circ}\text{C}$  خسارت ایجاد می‌کند. این بیماری عمدتاً در خیار دیده می‌شود و خسارت آن در فصل مرطوب تا ۵۰ درصد هم می‌رسد. در کنترل این بیماری، از روش‌های متعددی استفاده می‌شود. یکی از این روش‌ها استفاده از سموم است که کاربرد مکرر آن برای انسان و محیط زیست، اثرات جانبی نامطلوب دارد (۱). اسانس‌ها از مهم‌ترین مواد مؤثره گیاهان دارویی‌اند که به علت دارا بودن خصوصیات ضد میکروبی، از قبیل خصوصیات ضد قارچی و ضد باکتریایی، تحقیقات زیادی روی آن‌ها صورت گرفته است. اثر ضدباکتری اسانس‌های گیاهی، طی مطالعات مکرر به اثبات رسیده است (۶-۲). این ترکیبات، دارای سمیت اندک برای پستانداران بوده و نگرانی در مورد بقایای آن‌ها در محصولات غذایی، بی‌مورد است (۷). در این تحقیق، اثر بازدارندگی تعدادی از اسانس‌های گیاهی روی باکتری

## مواد و روش‌ها

## جمع‌آوری گیاهان و تهیه اسانس از آن‌ها

اسامی و بخش مورد استفاده همه گیاهان مورد استفاده، در جدول ۱ عنوان شده است. برای تهیه اسانس از گیاهان جمع‌آوری شده، اندام‌های آن‌ها در سایه و در دمای آزمایشگاه خشک گردید. سپس بافت‌های خشک شده، توسط آسیاب برقی (Moulinex، فرانسه) پودر شد و قطر مناسبی از ذرات گیاهی جهت عمل اسانس‌گیری به دست آمد. استخراج اسانس از نمونه‌های گردآوری شده گیاهی، به روش تقطیر با آب صورت گرفت (۸). اسانس‌های حاصل، در ظروف شیشه‌ای تمیز تیره رنگ، در یخچال نگهداری شدند. به منظور کنترل آلودگی‌های احتمالی اسانس‌های تهیه شده، مقدار اندکی از هر یک از آن‌ها به محیط کشت آگاردار غذایی افزوده شد و پس از نگهداری در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۸ ساعت، آلودگی میکروبی آن‌ها بررسی گردید.

جدول ۱: مشخصات گیاهان مورد استفاده در تهیه اسانس

بخش مورد استفاده	اسامی فارسی	اسامی انگلیسی	تیره گیاهی	اسامی علمی گیاهان
برگ و سرشاخه گل‌دار	بومادران	Milfoil	Compositae	<i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i>
برگ	شوید	Dill	Umbelliferae	<i>Anethum graveolens</i> L.
پوست درخت	دارچین	Cinnamon	Lauraceae	<i>Cinnamomum zylanicum</i> Nees.
میوه	زیره سبز	Cumin	Umbelliferae	<i>Cuminum cyminum</i> L.
برگ	اکالیپتوس	Eucalyptus	Myrtaceae	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehn.
غنچه ناشکفته	میخک	Clove	Caryophyllaceae	<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.
میوه	رازپانه	Fennel	Umbelliferae	<i>Foeniculum vulgare</i> Miller.
برگ	نعناع فلفلی	Peppermint	Labiatae	<i>Mentha piperita</i> L.
برگ	نعناع	Spearmint	Labiatae	<i>Mentha spicata</i> L.
برگ و ساقه	مرزه	Savory	Labiatae	<i>Satureja hortensis</i> L.
برگ و سرشاخه	آویشن	Thyme	Labiatae	<i>Thymus vulgaris</i> L.
ریزوم	زنجبیل	Ginger	Zingiberaceae	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.

## تهیه سوسپانسیون باکتریایی

انتقال داده شد. محیط‌های تلقیح شده، به داخل انکوباتور با دمای  $20^{\circ}\text{C}$  منتقل گردیدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت زمان انکوباسیون، سوسپانسیونی از کلنی‌های رشد یافته با رقت  $10^9 - 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup> به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد.

آمپول لیوفیلیزه حاوی باکتری *P. syringae pv. lachrymans* از مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی تهران دریافت شد و سوسپانسیون حاصل، به محیط‌های کشت King's B

رقت معین اسانس و یک دیسک شاهد مربوط به آن رقت استفاده شد. هر رقت در ۳ تکرار آزمایش گردید.

#### انکوباسیون

بر اساس یک آزمایش، اگر پتری‌ها قبل از شروع دوره انکوباسیون در دمای پایین یخچال قرار داده شوند، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها افزایش می‌یابد که این امر به علت افزایش انتشار اسانس‌ها در آگار است (۹). در این تحقیق هم ابتدا پتری‌های دیسک‌گذاری شده، در یخچال (دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ) به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند و سپس به درون انکوباتور با دمای  $20^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۸ ساعت منتقل گردیدند.

#### ارزیابی نتایج

پس از طی دوره انکوباسیون، قطر هاله‌های بازداشته از رشد در اطراف دیسک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شد و میانگین هاله بازدارندگی در هر پتری ثبت گردید. داده‌های حاصل، در سه تکرار در قالب آزمایش‌های فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به این منظور از نرم افزارهای EXCEL، SPSS، STATISTICA و MSTATC استفاده شد.

#### نتایج

تجزیه واریانس قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسک‌های اسانسی، در قالب آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور A ( تیمارهای ۱۲ اسانس) و فاکتور B ( تیمارهای ۴ رقت مختلف اسانس‌ها) بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد (جدول ۲).

#### تهیه محلول‌های مورد آزمایش از اسانس‌های گیاهی

در آزمایشگاه، سه سری رقت متوالی از غلظت اولیه تهیه شد. ابتدا اسانس صد برابر رقیق گردید. سپس دو سری متوالی رقت هر یک صد بار رقیق‌تر از غلظت اولیه، یعنی ده هزار برابر و یک میلیون برابر رقیق‌تر، تهیه گردید. در اتمام این مرحله برای هر اسانس ۴ ظرف حاوی غلظت اولیه اسانس،  $0/01$ ،  $0/0001$  و  $0/00001$  به دست آمد.

#### تهیه دیسک‌های حاوی اسانس

برای تهیه دیسک خام کاغذی، از کاغذ واتمن شماره ۴ استفاده شد. دیسک‌ها به کمک دستگاه کاغذ سوراخ‌کن و با قطر ۵ میلی‌متر تهیه شدند. سپس به داخل یک ظرف پتری شیشه‌ای، منتقل و با استفاده از اتوکلاو، استریل گردیدند. یک ساعت قبل از کشت در زیر هود، دیسک‌های کاغذی، به اسانس‌های تهیه شده گیاهی آغشته شدند و برای تهیه دیسک‌های شاهد، از آب مقطر استریل و در مورد اسانس‌های رقیق شده، از محلول آب و الکل استفاده گردید.

#### نحوه کشت و دیسک‌گذاری

در این تحقیق برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌ها، از روش تغییر یافته بوئر و همکاران استفاده شد.  $0/1$  میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها (با غلظت حدود  $10^7-10^9 \text{ cfu ml}^{-1}$ ) بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار پخش گردید. پس از پخش نمودن سوسپانسیون باکتری در سطح پتری اقدام به دیسک‌گذاری شد. در هر پتری، ۳ دیسک آغشته به یک

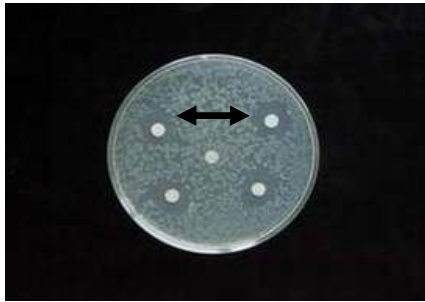
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر بازدارندگی اسانس‌های گیاهی روی باکتری *P. syringae pv. lachrymans* در آزمایشگاه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
فاکتور A (انواع اسانس)	۱۱	$0/322^{***}$
فاکتور B (انواع رقت‌ها)	۳	$1/050^{***}$
AB	۳۳	$0/092^{***}$
خطا	۹۶	$0/003^{***}$

$P < 0.001^{***}$  سطح معنی‌داری

احتمال  $0/01$  درصد وجود دارد. با توجه به این نکته که ۱۲ اسانس از ۷ خانواده مختلف گیاهی استحصال شده

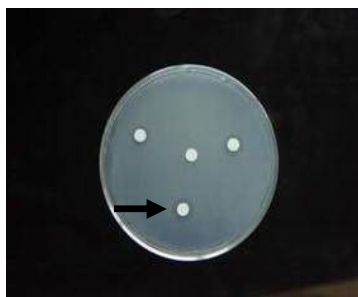
نتایج نشان داد که اولاً بین اثر بازدارندگی ۱۲ نوع اسانس بر باکتری فوق، اختلاف معنی‌داری در سطح



شکل ۱: هاله‌های عدم رشد باکتری عامل لکه زاویه‌ای خیار در اطراف دیسک‌های آغشته به اسانس مرزه (دیسک‌های واقع در اطراف) و عدم مشاهده این هاله در اطراف دیسک شاهد (دیسک مرکزی)



شکل ۲: هاله عدم رشد باکتری عامل لکه زاویه‌ای خیار در اطراف دیسک آغشته به اسانس میخک

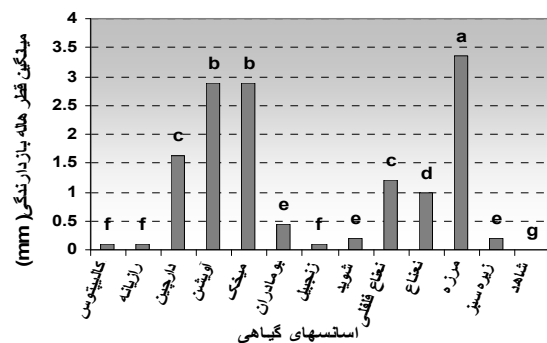


شکل ۳: هاله‌های عدم رشد باکتری عامل لکه زاویه‌ای خیار در اطراف دیسک‌های آغشته به اسانس زیره سبز (دیسک‌های واقع در اطراف) و عدم مشاهده این هاله در اطراف دیسک شاهد (دیسک مرکزی)

### بحث

طبق این نتایج، رقیق‌سازی اسانس‌ها، تأثیر بازدارندگی آن‌ها بر باکتری را به شدت کاهش داد و موثرترین رقت در هر اسانس، غلظت اولیه آن بود. ماده مؤثر میخک (اوزنول) از دسته مواد فنلی و دارای میزان زیادی اسانس است. برخی اسانس‌ها و ترکیب‌های آن‌ها که قبلاً به عنوان

بودند و عمدتاً دارای خصوصیات شیمیایی متمایز از هم بودند، تفاوت در اثر بازدارندگی آن‌ها دور از انتظار نبود. دوم، اثر ۴ رقت مورد استفاده بر باکتری فوق، از اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۱ درصد برخوردار بود. سوم، اثر متقابل بین انواع مختلف اسانس و رقت‌های آن‌ها نیز حاکی از همین اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد بود. این نتیجه نشان داد که تأثیر رقت‌های مختلف هر اسانس روی باکتری از رقت‌های مشابه اسانس‌های دیگر متفاوت بوده است. مقایسه میانگین ۴۸ ترکیب تیماری به روش LSD نشان داد که رقت‌های اولیه (اسانس خالص) اسانس‌های مرزه، آویشن و میخک، از بیشترین اثر روی باکتری برخوردار بودند ( نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه اثر بازدارندگی ۱۲ اسانس گیاهی بر باکتری *P. syringae pv. lachrymans* در شرایط آزمایشگاهی (هاله بازدارنده در شاهد = ۰)

همان‌طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد اسانس مرزه، دارای بیشترین اثر بازدارندگی است (شکل ۱). ماده مؤثر مرزه، شامل کارواکرول و سیمن از دسته ترکیبات فنلی است. میزان استحصال اسانس از این گیاه اندک (۰/۱٪) است. بعد از آن، اسانس‌های میخک (شکل ۲) و آویشن از نظر آماری، در یک سطح بازدارندگی قرار داشتند. اسانس‌های دارچین و نعناع، در رده سوم اثر بازدارندگی روی باکتری مورد بحث قرار گرفتند. ماده اصلی اسانس آلدئیدی دارچین و اسانس سنتی (Cetone) نعناع به ترتیب آلدئید سینامیک و کارون است و میزان استحصال اسانس از این دو گیاه بالا است. اسانس حاصل از گیاه زیره سبز، از رشد باکتری عامل لکه زاویه‌ای به میزان کمتری ممانعت نمود (شکل ۳).

- Towers, G.H.N., Goel, K., Arnason, J.T. 2000. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. J Ethnopharmacol 73: 161-170.
4. Perumal Samy, R., Ignacimuthu, S. 2000. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. J Ethnopharmacol 69: 63-71.
5. Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., Perumalsamy, P.L. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. J Ethnopharmacol 74: 217-220.
6. Watt, E.V., Pretorius, J.C. 2001. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. J Ethnopharmacol 76: 87-91.
7. Stroh, J., Wan, M.T., Isman, M.B., Moul, D.J. 1998. Evaluation of the acute toxicity to juvenile pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. Bull. Environ. Contam Toxicol 60: 923-930.
8. Mucciarelli, M., Camusso, W., Berteà, C.M., Bossi, S., Maffei, M. 2001. Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha piperita* on cucumber respiration. Phytochemistry 57: 91-98.
9. Khafagi, I. Dewslar, A. 2000. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. J Ethnopharmacol 365-376.
10. Sangwan, N.K., Verma, B.S., Verma, K.K., Dhinsa, K.S. 1990. Nematicidal activity of some essential plant oils. Pestic Sci 28: 331-335.
- حشره کش معرفی شده بودند (مثل اوژنول)، اخیراً در برابر نماتدهای بیمارگر گیاهی زیادی، مؤثر گزارش شده‌اند (۱۰). آویشن نیز عمدتاً دارای تیمول و کارواکرول از دسته ترکیبات فنلی با میزان اسانس زیاد است. در تجزیه اسانس *T. vulgaris* L. شمال ایتالیا ۴۴ ترکیب شناسایی شد که مهم‌ترین ماده‌های تشکیل دهنده، شامل سیمن، ترپینن و تیمول بودند. تیمول، مؤثرترین ترکیب در طیف وسیعی از میکروب‌ها بود و از رشد قارچ و نیز سم تولید شده توسط آن ممانعت نمود. بازدارندگی اسانس این گیاه در دو بیمارگر پس از برداشت توت‌فرنگی به نام‌های *Botrytis cinerea* و *Rhizopus stolonifer* اثبات شده است و نیز در این تحقیق، خاصیت متوقف‌کنندگی قارچی این اسانس، بیشتر از ویژگی کشندگی قارچ ارزیابی شد (۱۱). طی آزمایشی، اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی ۲۸ گونه گیاهی بررسی شد که گیاه آویشن در این بین، اثر بازدارندگی بسیار خوبی را روی قارچ‌ها و باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان داد (۱۲). در سال ۱۹۹۷، اثر ۴۹ اسانس روی بیمارگر میوه *Botrytis cinerea* آزمایش شد. در این تحقیق، فعالیت ضد میکروبی در اسانس‌ها شدیداً مرتبط با فنل‌های مونوترپنی، به ویژه تیمول، کارواکرول و اوژنول بود (۱۳). با توجه به این‌که اسانس‌های مورد استفاده در این تحقیق مقدماتی، از فعالیت ضدباکتریایی نسبتاً زیادی در شرایط آزمایشگاهی برخوردار بودند، بررسی میزان تاثیر آن‌ها روی این بیمارگر خیار در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای می‌تواند به دستاوردهای مثبتی در کنترل بیماری لکه زاویه‌ای خیار منجر شود.

## منابع

1. Horst, R. K. 1990. Westcott's Plant Disease Handbook. Van Nostrand Reinhold. pp. 953.
2. Branther, A., Grein, E. 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. J Ethnopharmacol 44: 35-40.
3. Omar, S., Lemonnier, B., Jones, N., Ficker, C., Smith, M. L., Neema, C.,

11. Reddy, B. M. V., Angers, P., Gosselin, A., 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.
12. Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 56: 3-12.
13. Wilson, C. L., Solar, J. M., El Chaute, A., Wisniewski, M. E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis* 81: 204-210.

