فصلنامه گیاه‌پزشکی
دانشگاه آزاد اسلامی شیراز
۱۹۷-۲۰۸ : (۳) ۹ - ۱۳۹۷

بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس و عصاره اتانولی گیاهان آنیسون و ترخون روی سه باکتری بیماری‌زای گیاهی (*Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae* pv *syringae*)

نبی خلیلی اقدم[۱]، عطاالله رحیمی[۲*]

(۱) گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، واحد سقز، کردستان، ایران.

(۲) (*) گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. Rahimi.ata.1@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۵/۰۳

چکیده

بسیاری از گیاهان ترکیباتی با خواص کنترلی دارند که اخیراً استفاده از آنها به عنوان جایگزین سموم شیمیایی در کنترل عوامل مخرب گیاهی، اهمیت بسزایی یافته است که در این میان، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مورد توجه ویژه‌ای می‌باشند. مطالعه مذکور برای بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس و عصاره اتانولی بذر گیاه آنیسون (*Pimpinella anisum*) و برگ‌های گیاه ترخون (*Artemisia dracunculus*) روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی (*Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae pv syringae*) انجام شد. تحقیق حاضر، براساس طرح کاملاً تصادفی در شرایط دمایی ۱ ± ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد، در شرایط تاریکی با غلظت‌های (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر) و به همراه ۳ تکرار برای هر غلظت از اسانس و عصاره گیاهان ذکر شده به همراه شاهد در بازدیدهای یک و دو هفته‌ای انجام گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان داد که تاثیر اسانس و عصاره گیاهان مورد مطالعه بر ممانعت رشد باکتری‌های مورد بررسی معنی‌دار بود و متناسب با افزایش غلظت‌های مورد استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان مورد بررسی، میزان رشد باکتری‌ها به شدت کاهش یافت. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان تاثیر عصاره‌های گیاهان مورد بررسی بر بازدارندگی رشد باکتری‌های مورد مطالعه بهتر از تاثیر اسانس گیاهان مورد نظر بود و عصاره‌های گیاهی مورد استفاده در مدت یک و دو هفته نسبت به اسانس‌های استفاده شده در همان زمان، اثرات بازدارندگی رشد بهتر و مناسب‌تری را نشان دادند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان اسانس و عصاره گیاهان آنیسون و ترخون را به عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم باکتری‌کش رایج مصنوعی علیه باکتری‌های مذکور معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: عصاره گیاهی، اسانس گیاهی، گیاه آنیسون، گیاه ترخون، باکتری‌های *Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae* pv *syringae*

مقدمه

امروزه با توجه به رشد روز افزون جمعیت کره‌ی زمین و افزایش نیاز بشر به مواد غذایی، افزایش تولید محصولات زراعی و باغی جهت تامین امنیت غذایی، ضرورتی انکار ناپذیر است که این امر نیاز به تولید بیشتر و در نتیجه سرمایه گذاری بیشتر در بخش

کشاورزی را موجه می‌سازد (Jaymand and Rezaee, 2007). هر ساله مقادیر قابل توجهی از فرآورده‌های گیاهی مورد هجوم آفات، عوامل بیماری‌زا، علف‌های هرز و یا گیاهان انگلی قرار می‌گیرند. علاوه براین، مقادیر زیادی از سموم شیمیایی برای مبارزه با این عوامل به کار گرفته می‌شود که میزان قابل ملاحظه‌ای از این مواد به صورت باقیمانده روی محصولات و فرآورده‌های کشاورزی و حجم هنگفتی نیز در طبیعت باقی می‌ماند. این امر ضرورت به کارگیری کنترل تلفیقی در مدیریت عوامل مخرب، به منظور کاهش ضایعات محصولات کشاورزی و نیز کاهش مصرف سموم شیمیایی را بیش از پیش ضروری می‌سازد (Dall *et al*., 2001).

اسانس‌ها و عصاره‌ها، ترکیباتی طبیعی، پیچیده و فرار هستند که دارای بوی قوی و قدرت تبخیر بالا می‌باشند و در گیاهان معطر به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شوند. این متابولیت‌های ثانویه توسط قسمت‌های مختلف گیاه از قبیل جوانه‌ها، برگ‌ها، ریزوم‌ها، پیازها و ساقه‌ها ساخته می‌شوند که در بیشتر موارد وظایفی مانند دورکنندگی، جلب کنندگی، ضد تغذیه‌ای، تحریک کنندگی تغذیه‌ای و گاهی سمیت برای موجودات زنده گیاهخوار را بر عهده دارند. ترکیبات گیاهی معمولاً در طبیعت زود تجزیه می‌شوند، سمیت کمتری برای انسان و سایر پستانداران داشته و اثرات زیست محیطی کمتری نسبت به سموم شیمیایی دارند (Isman & Machial, 2006; Rahimi *et al*., 2017). در حال حاضر بیش از ۳۰۰۰ اسانس شناسایی شده است که بیش از ۳۰۰ اسانس و برخی از ترکیبات آن‌ها در داروسازی، کشاورزی، غذا، بهداشت و صنایع آرایشی و عطرسازی اهمیت تجاری پیدا کرده اند (Bakkali *et al*., 2008).

آنیسون یا بادیان رومی (*Pimpinella anisum*) گیاهی است علفی و یکساله از خانواده‌ی چتریان، با ارتفاع ۳۰ تا ۷۰ سانتی‌متر که گل‌های سفید رنگ آن به شکل گل آذین چتر مرکب دیده می‌شود. بذور این گیاه دارای ترکیباتی چون اسانس، صمغ، ترکیبات قندی و روغن می‌باشد. اسانس آنیسون اهمیت فوق العاده‌ای در صنایع دارویی دارد (Karimzadeh *et al*., 2007). ترخون (*Artemisia dracunculus*) گیاهی است علفی، پایا و به شکل بوته‌ای که ارتفاع آن گاهی به یک متر هم می‌رسد. برگ‌های این گیاه باریک، نوک تیز و به رنگ سبز و دارای ساقه‌های تقریباً نازک و شکننده است که در اثر شکسته شدن بوی اسانس آنها به مشام می‌رسد. برگ‌های ترخون معطر بوده و دارای رایحه‌ی خاصی می باشند (Ayoughi *et al*., 2012).

باکتری *Erwinia amylovara* عامل بیماری آتشک (Fire blight)، یکی از بیماری‌های مهم درختان میوه‌ی دانه‌دار در جهان است. مشکلات کنترل این بیماری، بخصوص در مورد استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و همچنین از آنجایی که روش‌های دیگر کنترل شیمیایی نیز برای مبارزه با بیماری آتشک سیب و گلابی در دست نیست، روش بیولوژیک می‌تواند به عنوان بهترین جایگزین سموم شیمیایی برای کنترل این بیماری مورد توجه قرار گیرد (Mooslemi Khani & Sadeghi, 2011). باکتری *Agrobacterium tumefaciens* عامل بیماری باکتریایی گال طوقه است و یک آلفا پروتو باکتری از خانواده Rhizobiaceae، گرم منفی، فاقد اسپور، متحرک، میله‌ای شکل و هوازی است که زندگی آزاد در خاک دارد. این باکتری عامل بیماری گال طوقدار (Crown Gall)، در طیف وسیعی از گیاهان دولپه‌ای بخصوص خانواده Rosaceae مانند سیب، گلابی، هلو، گیلاس، بادام و تمشک است (Sayad *et al*., 2012). باکتری *Pseudomonas syringae* pv *syringae* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار می‌باشد. این بیماری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار می‌باشد که به آن بلاست شکوفه، بلاست غنچه، سوختگی باکتریایی، صمغ باکتریایی، مرگ سرشاخه یا خشکیدگی تیز اطلاق می‌شود. به دلیل اینکه در بیماری‌های گیاهی بیشتر پیشگیری تا درمان مطرح است لذا برای کنترل این باکتری، اگر از عوامل بیولوژیک استفاده شود، بهتر است (Abbasi *et al*., 2012). در یک مطالعه‌ای، تاثیر عصاره سیر و میوه گیاه اسپند را روی بازدارندگی رشد باکتری *Pseudomonas syringae* مثبت گزارش نمودند و بیان کردند که این عصاره‌ها بخو بی روی رشد باکتری مورد نظر تاثیر گذاشته و مانع رشد و خسارت‌زایی آن می‌گردد (Ahmadi, 1990). در تحقیق دیگری، اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های زرشک و سیر را روی باکتری *Agrobacterium tumefaciens* عامل بیماری سرطان طوقه انگور و باکتری

Erwinia amylovora عامل بیماری آتشک سیب و گلابی را مثبت گزارش نمود (Hayes, 1964). همچنین، Roberto *et al.* (2000) اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه رازیانه را روی ۲۵ جنس باکتری بیماری‌زای حیوانی و گیاهی مثبت گزارش کردند. پژوهشی دیگر توسط Borgio *et al.* (2008) روی اثر اسانس *Ocimum sanctum* Tulsi, 1753 را روی قارچ بیمارگر *Metarhizium anisopliae* انجام شد آنها اعلام کردند که اسانس استخراج شده از برگ و ریشه گیاه *O. sanctum* سازگاری قابل توجهی با قارچ مورد نظر داشته و می‌توان آنها را به طور همزمان جهت کنترل آفات و بیماری‌ها در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات و بیماری‌ها به کار برد. در مطالعه دیگری، Katooli *et al.* (2011) بیان نمودند که اسانس و عصاره‌های گیاهی از آفتکش‌های زیستی هستند که کاربرد آنها در سطح جهان با توجه به پیشرفت کشاورزی ارگانیک، تولید و کاربرد آفتکش‌هایی که با محیط زیست سازگار و تجدیدپذیر باشند، به طور گسترده‌ای رو به افزایش است. هدف تحقیق حاضر، بررسی تاثیر اسانس و عصاره اتانولی گیاهان آنیسون و ترخون در کنترل سه باکتری بیماری‌زای گیاهی (*Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae* pv *syringae*) می‌باشد. همچنین مطالعه حاضر در راستای اهداف کنترل بیولوژیک برای پاسخگویی به این سئوال: آیا اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در راستای کنترل بیولوژیک برای کنترل باکتری‌های ایجاد کننده بیماری‌های گیاهی مناسب و قابل توصیه هستند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

* شرایط انجام آزمایش

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه‌های گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد و مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان آذربایجان غربی انجام شد. دمای انکوباتورهای مورد استفاده ۲ ± ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی آنها ۵ ± ۶۵ درصد بود.

* جمع‌آوری گیاهان مورد آزمایش

گیاهان مورد مطالعه که شامل گیاه ترخون (*Artemisia dracunculus*) و گیاه آنیسون (*Pimpinella anisum*) بود، از مراتع و کوهستان‌های کوه خلیل شهرستان ارومیه تهیه و برای اسانس و عصاره‌گیری مورد بررسی قرار گرفتند. اندام‌های هوایی گیاه ترخون و بذور گیاه آنیسون توسط دستگاه خردکن برقی کاملاً بصورت پودر در آمدند و برای تهیه اسانس و عصاره مورد استفاده قرار گرفتند.

* اسانس‌گیری

برای تهیه اسانس این گیاهان، از روش تقطیر با بخار آب (Hydro distillation) و دستگاه کلونجر استفاده شد. برای تهیه اسانس، ۱۰۰ گرم از اندام‌های هوایی گیاه ترخون و ۱۰۰ گرم از بذر گیاه آنیسون که با دستگاه خردکن پودر شده بودند، را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و در دستگاه کلونجر شیشه‌ای (مدل فارماکوپه) ریخته و اسانس‌گیری انجام شد.

* عصاره‌گیری

برای تهیه عصاره اتانولی، ۱۰۰ گرم از اندام‌های هوایی گیاه ترخون و ۱۰۰ گرم از بذر گیاه آنیسون که پودر شده‌اند را، در ۷۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۸ % به مدت ۷۲ ساعت درون ظرف شیشه‌ای سر بسته در محل کاملاً تاریک قرار گرفت. سپس محلول حاصل را توسط توری صاف نموده و درون سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و بعد از جداسازی فاز جامد از مایع، محلول حاصل را درون ظروف قهوه‌ای دربسته ریخته و دور آن را با فویل آلومینومی و پارافیلم پوشانده و به یخچال با دمای ۴ درجه

سلسیوس منتقل شد جهت استخراج الکل از عصاره مورد نظر، از دستگاه روتاری با دمای ۵۰ درجه سلسیوس و سرعت ۷۰ دور تا یک سوم حجم اولیه استفاده شد.

* تهیه باکتری‌های مورد نیاز

باکتری‌های مورد نیاز در پژوهش حاضر که شامل سه نوع باکتری *Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae* pv *syringae* بودند، از مرکز باکتری شناسی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند.

* تهیه محیط کشت و غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره

برای بررسی تاثیر اسانس و عصاره گیاهان ترخون و آنیسون، غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر از اسانس و عصاره‌های به‌دست آمده به محیط کشت‌هایی که از محلول نیتریت و آگار برای کشت باکتری‌ها تهیه شده بود، اضافه شد و طی بازدیدهای یک و دو هفته بعد از کشت، میزان رشد باکتری‌ها در محیط‌های حاوی اسانس و عصاره به همراه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به اینکه ۵ غلظت از اسانس و ۵ غلظت از عصاره و هم چنین یاداشت برداری در طی ۲ هفته انجام گرفت و این شرایط با شاهد در ۳ تکرار مقایسه گردید، مجموعاً ۱۵۶ محیط کشت و پتری‌های شیشه ای تهیه شد.

* تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش‌ها بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد که فاکتورهای آزمایشی شامل ۲ گیاه به‌نام‌های گیاه ترخون و آنیسون و سه نوع باکتری *Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae* pv *syringae* و غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره‌ها بودند. برای هر دو گیاه، نمونه‌برداری در دو مرحله بعد هفت و ۱۴ روز انجام و نتایج بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی برای ارزیابی روابط بین اسانس‌ها و عصاره‌ها و همچنین عصاره‌ها و باکتری‌ها انجام شد. در صورت معنی‌دار بودن اثرات متقابل روابط، از رویه برش دهی اثر متقابل بهره گرفته شد و صفات کمی مثل سطوح عصاره و اسانس نیز از رویه رگرسیون استفاده شد. بعد از انجام مفروضات تجزیه واریانس، تجزیه واریانس داده‌ها، مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره بر میزان رشد باکتری‌های مورد مطالعه، از روش LSD در سطح آماری ۱ درصد با استفاده از نرم افزار SAS (V. 9.2) انجام شد.

نتایج و بحث

* تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثر اسانس‌ها روی باکتری‌ها در مدت یک و دو هفته پس از اعمال تیمار

- تاثیر اسانس گیاه آنیسون روی سه گونه باکتری *Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae pv syringae*

نتایج تجزیه واریانس تاثیر اسانس گیاه آنیسون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در مدت یک و دو هفته پس از اعمال تیمار نشان داد که اثر غلظت‌های مصرفی اسانس و ممانعت رشد باکتری‌های مورد مطالعه در سطح آماری ۱ درصد در مقایسه با شاهد معنی‌دار شد اما اثر متقابل باکتری‌ها و اسانس‌ها معنی‌دار نشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین اثر اسانس گیاه آنیسون روی سه نوع باکتری مورد مطالعه در طی یک و دو هفته پس از اعمال تیمار نشان داد که باکتری‌های مورد مطالعه، پاسخ مشابهی به کاربرد غلظت‌های

مختلف اسانس نشان ندادند و بیشترین واکنش به اسانس در باکتری اول و کمترین واکنش در باکتری سوم مشاهده شد. نتایج نشان داد که واکنش هر سه باکتری به کاربرد اسانس متفاوت بود (جدول ۲).

جدول ۱ - تجزیه واریانس اثر اسانس گیاه آنیسون روی سه گونه باکتری در طی یک و دو هفته پس از اعمال تیمار

Table 1. Variance analysis of *Pimpinella anisum* essential oil on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	Degree of freedom	Effects level (after one week)	Effects level (after two weeks)
Repeat	2	0.0004**	0.002**
Bacteria	2	0.0001**	0.0004**
Essential oil level	4	0.0008**	0.00143**
Bacteria × essential oil level	8	0.00001	0.000004
Error	28	0.00002	0.000005
C.V		12.8	22.8

جدول ۲ - مقایسه میانگین اثر اسانس گیاه آنیسون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 2. Mean comparison of *Pimpinella anisum* essential oil on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Bacteria	Functional grouping (After 7 days)	Functional grouping (After 14 days)
Erwinia amylovora	6.52^{a}	0.025^{a}
Agrobacterium tumefaciens	5.59^{b}	0.019^{b}
Pseudomonas syringae pv *syringae*	4.78^{c}	0.015^{c}
LSD(0.05)	0.073	0.005

تجزیه رگرسیون اثر سطوح مختلف اسانس در هر سه نوع باکتری مورد مطالعه طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار نشان داد که به ازای هر واحد افزایش در غلظت اسانس، میزان رشد باکتری کاهش یافت و افزایش غلظت اسانس به صورت خطی باعث کاهش رشد باکتری‌ها بود (جدول۳).

جدول ۳- تجزیه رگرسیون اثر اسانس گیاه آنیسون روی سه نوع باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 3. Regression analysis of *Pimpinella anisum* essential oil on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	a ± se	b ± se	R^2	CV
Effect of essential oil (after 7 days)	0.029 ± 0.002	0.0005 ± 0.00007	56	21.1
Effect of essential oil (after 14 days)	0.04 ± 0.004**	-0.0008 ± 0.001**	41	22.4

- تاثیر اسانس گیاه ترخون *Artemisia dracunculus* روی سه گونه باکتری *Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae pv syringae*

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تاثیر اسانس گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی یک و دو هفته پس از اعمال

تیمار نشان داد که اثر غلظت‌های مصرفی اسانس و ممانعت رشدی باکتری‌های مورد مطالعه در سطح آماری ۱ درصد در مقایسه با شاهد معنی‌دار، ولی اثر متقابل باکتری‌ها و اسانس‌ها معنی‌دار نبود (جدول۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر اسانس گیاه ترخون روی سه نوع باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 4. Variance analysis of *Artemisia dracunculus* essential oil on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	Degree of freedom	Effects level (after one week)	Effects level (after two weeks)
repeat	2	0.0005**	0.004**
Bacteria	2	0.0003**	0.0006**
essential oil level	4	0.0023**	0.0037**
Bacteria × essential oil level	8	0.00009	0.000009
error	28	0.00002	0.000009
C.V		232.7	11.22

نتایج مقایسه میانگین اثر اسانس گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه طی ۷ و ۱۴ روز پس از اعمال تیمارنشان داد که باکتری‌های مورد مطالعه، پاسخ مشابهی به کاربرد غلظت‌های مختلف اسانس نشان ندادند و بیشترین واکنش به اسانس در باکتری اول و کمترین واکنش در باکتری سوم مشاهده شد. نتایج نشان داد که واکنش هر سه باکتری به کاربرد اسانس متفاوت بود (جدول۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر اسانس گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 5. Mean comparison of *Artemisia dracunculus* essential oil on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Bacteria	Functional grouping (After 7 days)	Functional grouping (After 14 days)
Erwinia amylovora	0.025^{a}	0.035^{a}
Agrobacterium tumefaciens	0.019^{b}	0.028^{b}
Pseudomonas syringae pv *syringae*	0.015^{c}	0.022^{c}
LSD(0.05)	0.003	0.002

تجزیه رگرسیون اثر سطوح مختلف اسانس گیاه ترخون در هر سه گونه باکتری مورد مطالعه طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار نشان داد که به ازای هر واحد افزایش در غلظت اسانس، میزان رشد باکتری کاهش و افزایش غلظت اسانس به صورت خطی باعث کاهش رشد باکتری‌ها شد (جدول ۶).

جدول ۶- تجزیه رگرسیون اثر اسانس گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 6. Regression analysis of *Artemisia dracunculus* essential oil on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	a ± se	b ± se	R^2	CV
Effect of essential oil (after 7 days)	44.76 ± 1/69**	-747.57 ± 66.1**	74	24.2
Effect of essential oil (after 14 days)	0.066 ± 0.002**	-0.0001 ± 0.00008**	84	27.1

*** تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثر عصاره‌ها روی باکتری‌ها در مدت یک و دو هفته پس از اعمال تیمار**

- تاثیر عصـــاره گیاه آنیســون *Pimpinella anisum* روی ســـه گونه باکتری *Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae pv syringae*

نتایج تجزیه واریانس تاثیر عصـاره گیاه آنیسـون روی سـه گونه باکتری مورد مطالعه در مدت یک و دو هفته پس از اعمال تیمار نشـان داد که اثر غلظت‌های مصـرفی از عصـاره و ممانعت از رشـد باکتری‌های مورد مطالعه در سـطح آماری ۱ درصـد در مقایسـه با شـاهد معنی‌دار ولی اثر متقابل باکتری‌ها و عصاره معنی‌دار نبود (جدول۷).

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر عصاره الکلی گیاه آنیسون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 7. Variance analysis of *Pimpinella anisum* ethanol extract on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	Degree of freedom	Effects level (after one week)	Effects level (after two weeks)
repeat	2	0.0002**	0.0001**
Bacteria	2	0.0008**	0.001**
essential oil level	4	0.0016**	0.0022**
Bacteria × essential oil level	8	0.000009	0.000001
error	28	0.000007	0.000008
C.V		10.05	7.7

نتایج مقایسـه میانگین اثر عصـاره الکلی گیاه آنیسـون روی سـه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار نشـان داد که باکتری‌های مورد مطالعه، پاسـخ مشـابهی به کاربرد غلظت‌های مختلف عصـاره الکلی گیاه آنیسـون نشـان ندادند و بیشترین واکنش به عصاره در باکتری اول و کمترین واکنش در باکتری سوم مشاهده شد. نتایج نشان داد که واکنش هر سه باکتری به کاربرد عصاره متفاوت بود (جدول ۸).

جدول ۸- مقایسه میانگین اثر عصاره گیاه آنیسون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 8. Mean comparison of *Pimpinella anisum* ethanol extract on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Bacteria	Functional grouping (After 7 days)	Functional grouping (After 14 days)
Erwinia amylovora	0.031[a]	0.046[a]
Agrobacterium tumefaciens	0.024[b]	0.036[b]
Pseudomonas syringae pv *syringae*	0.017[c]	0.026[c]
LSD(0.05)	0.001	0.002

تجزیه رگرسیون اثر سطوح مختلف عصاره الکلی گیاه آنیسون در هر سه گونه باکتری مورد مطالعه طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار نشـان داد که به ازای هر واحد افزایش در غلظت عصـاره الکلی گیاه آنیسـون، میزان رشـد باکتری کاهش یافت و افزایش غلظت اسانس به صورت خطی باعث کاهش رشد باکتری‌ها شد (جدول ۹).

جدول ۹- تجزیه رگرسیون اثر اسانس گیاه آنیسون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 9. Regression analysis of *Pimpinella anisum* ethanol extract on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	a ± se	b ± se	R^2	CV
Effect of essential oil (after 7 days)	0.05 ± 0.002**	-0.0008 ± 0.00007**	77	27.35
Effect of essential oil (after 14 days)	0.066 ± 0.003**	-0.0009 ± 0.00009**	72	24.08

- تاثیر عصاره گیاه ترخون *Artemisia dracunculus* روی سه گونه باکتری *Erwinia amylovora*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Pseudomonas syringae pv syringae*

نتایج تجزیه واریانس تاثیر عصاره گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه بعد از هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار نشان داد که غلظت‌های مصرفی از عصاره و ممانعت رشدی باکتری‌های مورد مطالعه در سطح آماری ۱ در مقایسه با شاهد درصد معنی‌دار، اما اثر متقابل باکتری‌ها و عصاره‌ها معنی‌دار نشد (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- تجزیه واریانس اثر عصاره الکلی گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 10. Variance analysis of *Artemisia dracunculus* ethanol extract on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	Degree of freedom	Effects level (after one week)	Effects level (after two weeks)
repeat	2	0.0005**	0.0005**
Bacteria	2	0.0001**	0.0013**
essential oil level	4	0.002**	0.002**
Bacteria × essential oil level	8	0.00001	0.000004
error	28	0.00004	0.000003
C.V		5.18	3.93

نتایج مقایسه میانگین اثر عصاره الکلی گیاه ترخون روی سه گونه باکتری طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار نشان داد که باکتری‌های مورد مطالعه، پاسخ مشابهی به کاربرد غلظت‌های مختلف عصاره نشان ندادند و بیشترین واکنش به عصاره در باکتری اول و کمترین واکنش در باکتری سوم مشاهده شد. نتایج نشان داد که واکنش هر سه باکتری به کاربرد عصاره متفاوت بود (جدول ۱۱).

جدول ۱۱- مقایسه میانگین اثر عصاره گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 11. Mean comparison of *Artemisia dracunculus* ethanol extract on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Bacteria	Functional grouping (After 7 days)	Functional grouping (After 14 days)
Erwinia amylovora	0.05^{a}	0.059^{a}
Agrobacterium tumefaciens	0.04^{b}	0.049^{b}
Pseudomonas syringae pv *syringae*	0.03^{c}	0.04^{c}
LSD(0.05)	0.001	0.0015

تجزیه رگرسیون اثر سطوح مختلف عصاره الکلی در هر سه گونه باکتری مورد مطالعه طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار نشان داد که به ازای هر واحد افزایش در غلظت عصاره گیاه ترخون، میزان رشد باکتری کاهش یافت و افزایش غلظت عصاره به صورت خطی باعث کاهش رشد باکتری‌ها شد (جدول ۱۲).

جدول ۱۲- تجزیه رگرسیون اثر اسانس گیاه ترخون روی سه گونه باکتری مورد مطالعه در طی هفت و ۱۴ روز پس از اعمال تیمار

Table 12. Regression analysis of *Artemisia dracunculus* ethanol extract on three bacterial species studied during one and two weeks after application of the treatment.

Source of variance	a ± se	b ± se	R^2	CV
Effect of essential oil (after 7 days)	0.073 ± 0.003**	-0.001 ± 0.00009**	74	21.1
Effect of essential oil (after 14 days)	0.081 ± 0.003**	-0.001 ± 0.00001**	72	19.1

استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهي با خواص باکتری‌کشی داراي اثرات سوء زیست محیطي اندکي نسبت به سموم شیمیایی متداول باکتری‌کش بوده و سمیت کمتري براي انسان و پستانداران به دنبال دارند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد تاثیر اسانس و عصاره‌های گیاه آنیسون و ترخون روی بازدارندگی رشد باکتری‌های مورد مطالعه در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود و که هر چقدر غلظت اسانس و عصاره‌های گیاهی مورد استفاده، افزایش یابد میزان رشد باکتری‌ها به‌شدت کاهش خواهد یافت. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌ها نسبت به اسانس‌ها تاثیر کنترلی مناسب‌تری روی باکتری‌های مورد مطالعه داشتند. در بین اسانس و عصاره‌های مورد استفاده، اسانس و عصاره گیاه آنیسون تاثیر کنترلی مناسب‌تری روی باکتری‌های مورد مطالعه داشت و بهترین تاثیر کنترلی، روی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* توسط اسانس و عصاره گیاه آنیسون در مدت دو هفته مشاهده گردید. از این رو نتایج این پژوهش با نتایج تحقیقات مختلفی که توسط سایر محققان در ارتباط با تاثیر اسانس و عصاره‌های گیاهی روی بازداندگی رشد باکتری-های بیماری‌زای گیاهی صورت گرفته است مطابقت دارد. به طور مثال، Sayad *et al.* (2012) عامل بیماری پوسیدگی نرم گیاه زینتی سینگونیوم (*Pectobacterium carotovorum*) را با استفاده از اسانس‌های گیاهی و آنتی بیوتیک‌ها در دو سطح آزمایشگاه و گلخانه بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که اریترومایسین و اسانس گیاه آویشن در کنترل بیماری پوسیدگی نرم گیاه زینتی سینگونیوم از بیشترین کارایی برخوردار بودند و نتایج مطالعه حاضر را مبنی بر خواص کنترلی اسانس‌های گیاهی روی عوامل خسارت‌زای گیاهی تایید کرد. در مطالعه‌ی دیگری، Hevesi *et al.* (2005) خواص ضد باکتریایی ۳۴ گونه گیاهی را روی باکتری *Pseudomonas savastanoi* و *E.amylovara* مورد مطالعه قرار دادند. این محققان نشان دادند که اسانس گیاه *Xanthomonas vesicatoria* و گونه‌های مختلف گیاه نعناع و آویشن بیشترین خاصیت بازدارندگی را ایجاد کردند، نتایج تحقیق این محققان با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر خاصیت بازدارندگی اسانس و عصاره‌های گیاهی هم‌خوانی داشت.در مطالعه‌ی دیگری، Mahmoodi *et al.* (2010) اثرات ضد باکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهان دارویی بر باکتری عامل شانکر و لکه برگی درختان میوه هسته‌دار را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که اسانس‌های مورد استفاده اثرات کنترلی خوبی بر رشد باکتری‌های مخرب کشاورزی دارند و نتایج مطالعه حاضر را تایید کردند. همچنین، خواص بازدارندگی رشد، توسط اسانس و عصاره‌های گیاهی روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهان در سایر مطالعات نیز گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (Batish *et al.*,2008; Doornbos *et al.*, 2008; Mahmoodi *et al.*, 2010; Asi *et al.*, 2010; Hosseinzadeh *et al.*, 2012; Weller *et al.*, 2012). در دهه اخیر استفاده از ترکیبات گیاهی در قالب مبارزه با بیماری‌های انسانی و گیاهی به‌شدت رو به افزایش است و بشر استفاده از ترکیبات گیاهی را در بسیاری از مواقع به ترکیبات شیمیایی رایج ترجیح می‌دهد، بنابراین استفاده از ترکیبات طبیعی

گیاهی علیه بیماری‌های گیاهی که به نوعی با سلامت انسان نیز در ارتباط است امری ضروری به نظر می‌رسد. در این میان می‌توان با آزمایشات تکمیلی به ترکیبات گیاهی موثری دسترسی پیدا کرد و با استفاده از این ترکیبات در کنار سایر روش‌های بیوکنترلی و استفاده از ارقام مقاوم در قالب یک مدیریت تلفیقی برای کنترل این بیماری‌ها اقدام نمود. همچنین با توجه به کم دوام بودن اسانس و عصاره-های گیاهی در طبیعت و سادگي کاربرد آنها، مي‌توانند اسانس و عصاره اتانولی گیاهان آنیسون و ترخون را به عنوان یک جایگزین مناسب براي سموم شیمیایي رایج مصنوعی علیه کنترل این باکتری‌ها معرفی کرد. لذا با انجام تحقیقات بیشتر مي‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان با استحصال ماده موثر اسانس و عصاره‌های گیاه آنیسون و ترخون، امکان به کارگیري یک باکتری‌کش گیاهی در مدیریت تلفیقي بیماری‌های باکتریایی براي کاهش مصرف سموم باکتری‌کش به وجودآید. امید است که نتایج این تحقیق بتواند در کنار نتایج سایر آزمایش‌های دیگر، در رسیدن به اهداف مدیریت بیماری‌ها در کشاورزی پاک، مثمرثمر باشد.

سپاس‌گزاری

از مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی به خاطر تامین اعتبار، امکانات و مساعدت در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abbasi, V., Rahimian, H., Tajik M., Ghanbari, M. & Razaian, V. 2011. Evaluation of genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* isolates, bacterial canker bacteria of nuclear fruit trees in some northern provinces of Iran. *Applied Entomology and Phytopathology*, 47(4): 389-404. (In Farsi with English abstract)

Ahmadi, A. 1990. Investigation antibacterial activity of some plant extract and some bacterial epiphyte against casual canker of stone fruit tree. Ms Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Asi, M.R., Bashir, Afzal, M.H., Ashfaq, M. & Sahi, S.T. 2010. Compositions of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticide. *Pakistan journal of Botani*, 42(6): 4207-4214.

Ayoughi, F., Barzegar, M., Sahari, M. & Naghdibadi, H. 2011. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and endemic *Matricaria chammilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. *Journal of Agriculture Science and Technical*, 13(2): 79-88.

Batish, D. B., Singh, H.P., Kohli, R.K. & Kaur, S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Journal of Forest and Ecology Management*, 256(5): 2166-2174.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicol*, 46 (2): 446-475.

Borgio, J.F., Bency, B.J. & Sharma, N. 2008. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) stock. With *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) (Lamiaceae) extracts. Ethnobotanical Leaflets, 12: 698-704.

Dall Bello, G., Padin, S., Lopez, C. & Fabrizio, M. 2001. Laboratory evaluation of chemical biological control of rice weevil *Sitophilus oryzae* in stored grain. *Journal of Stored product Research*, 37(3): 77-84.

Doornbos, R.F., Geraats, B.P.J., Kumanae, E.E.,Van Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M. 2011. Effect of Jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling on the Rhizosphere community of Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24: 395-407.

Hayes, L.E. 1964. Survey of higher plant for presence of antibacterial substance. *Bot Gas*, 108: 11-108.

Hevesi, L.E., Boja, N., Banatfy, R., Babulka, P. & Toth, M. 2005. *In vitro inhibition of growth of Erwinia amylovora by palnt oils.* Biocontrol of bacterial plant disease 1 st symposium, Seeheim, Dermstadt, Germany. Pp: 4-262.

Hosseinzadeh, J., Farazmand, H. & Karimpour, Y. 2014. Insecticidal essential oil on adult of *Lasioderma serricorna* F. (Col: Anobiidae) under laboratory condition. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 30(1): 123-133.

Isman, M.B. & Machial, C.M. 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. In: Rai, M, and Carpinella, M.C. (Eds), Naturally Occurring Bioactive Compounds. *Advances in Phytomedicine*, 32: 29-44.

Jaymand, K. & Rezaee, M. 2007.Essential oil, Distillations Apparatuses, test Method of essential oil and Retention Indices in Essential oil Analysis. *Iranian Society of Medicinal Plants*, 23(4): 106 - 8.

Katooli, N., Maghsodlo, R. & Razavi, S.E. 2011. Evolution of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 3(2): 41-43.

Karimzadeh, F., Hosseini, M., Mangeng, D., Alavi, H., Hassanzadeh, G.R, Bayat, M., Jafarian, M., Kazemi, H. & Gorji, A. 2012. Anticonvulsant and neuroprotective effects of Pimpinella anisum in rat brain. *BMC Complementary and Alernative Medicine*, 12(76): 2-9.

Mahmoodi, H., Rahnema, K. & Arikhani, M. 2010. Antibacterial effect of essential oil and aqueous extract of Medicinal plants on Shangger factor bacteria and leaf spot of nucleated fruit trees. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 9(36): 34-42. (In Farsi with English abstract).

Mooslemi Khani, K. & Sadeghi, L. 2011. Developing the accuracy and sensitivity of novel methods for detecting *Erwinia amylovora*, in plant materials with hidden contamination. *Journal of Medicinal and Aromatic plantPlants*, 47(4): 471-474. (In Farsi with English abstract)

Rahimi, A., Khorram Del, Y. & Moradpour, F. 2017. The effect of ethanolic extract of Thyme (*Thymus caucasicus*) on Varroa mite (*Varroa destructor*), ectoparasite mite of *Apis mellifera* Meda (Hym: Apidae). *Biologija*, 63(2): 105-112.

Roberto, G., Baratta, M.T., Deans, S.G. & Dorman, H.J. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Plant Medicine*, 66: 93-687.

Sayad, S., Hassanzadeh, N., Ghasemi, A. & Nazarian, A. 2012. Control of the decaying agent of soft decay plant Sinonium (Pectobacterium carotovovorum) using herbal essences and antibiotics in two levels of laboratory and greenhouse. *Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants*, 28(4): 730-740.

Weller, D.M., Mavridi, D.V., Van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M. 2012. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. Tomato by 2,4- diacetyphoroglucinol-producing pseudomonas fluoresces. *Phytopathology*, 102: 403-412.

Plant Protection Journal
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
2018 – **9** (**3**): 197-208

Study of antibacterial effect of essential oil and ethanol extract of the *Pimpinella anisum* and *Artemisia dracunculus* on three plant pathogenic bacteria (*Erwinia amylovora, Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)

Nabi Khalili Aghdam[1], Ataollah Rahimi[2*]

(1) Department of Agriculture, Piamnoor University, Saqhez, Kurdistan, Iran.
(2) (*) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi university, Kermanshah, Iran. Rahimi.ata.1@gmail.com

Abstract

Essential oils and extracts are suitable compounds as alternative chemicals. Many plants have compounds with control properties that recently the use of herbal products as alternative to chemical pesticides for control of plant-damaging agents is more important and the essential oils and herbal extract are of particular interest. The present study was carried out to investigate the antibacterial effects of essential oil and ethanolic extract of *Pimpinella anisum* and *Artemisia dracunculus* leaves on *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. This study was done based on a completely randomized design with temperature conditions of 28 ± 1 °C and relative humidity of 65 ± 5%, in dark conditions with concentrations (10, 20, 30, 40 and 50 µl) plus 3 replicates for each concentration of essential oil and extract with control At one and two weekly visits. The results showed that antibacterial effect of essential oil and ethanol extract of *Pimpinella anisum* and *Artemisia dracunculus* on bacteria *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas syringae* pv *syringae* were significant compared to the control. Also, whatever the concentrations of essential oils and extracts used in this study increased, so the rate of bacterial growth significantly decreased. Moreover, the results showed that the antibacterial effect of extracts on the growth of bacteria examined in this study is better than the essential oils studied and plant extracts in visit one or two weeks at the same time better than essential oils and show better appropriate action. According to the results of this study, essential oils and extracts of *Pimpinella anisum* and *Artemisia dracunculus* can be introduced as an appropriate alternative to commonly used Chemical bactericides against these bacteria.

Keywords: Plant extract, essential oil, *Pimpinella anisum, Artemisia dracunculus, Erwinia amylovora, Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas syringae* pv *syringae.*