

**بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس چند گیاه دارویی بر باکتری بیماری‌گر برنج *Xanthomonas oryzae* pv.*****oryzae* و باکتری غیربیمارگر *Pseudomonas fluorescens* CHA0**بهرخ شعبانی<sup>۱</sup>، رسول رضائی<sup>۲\*</sup> حبیب‌اله چاره‌گانی<sup>۳</sup> و امین صالحی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران

۲ و ۳. استادیاران، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۰)

**چکیده**

بیماری بلایت باکتریایی برنج با عامل *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* یکی از مهمترین بیماری‌های برنج در سراسر دنیا می‌باشد. وقوع این بیماری در ایران نیز گزارش گردیده است. در تحقیق حاضر اثرات ضدباکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی موجود در طبیعت استان کهگیلویه و بویراحمد بر این باکتری و همچنین باکتری غیربیماری‌زای *Pseudomonas fluorescens* CHA0 مورد بررسی قرار گرفت. بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن دنايي، رزماری، رازیانه، پونه، نعنای و شمعاندی معطر در شرایط آزمایشگاه به روش نشر در آگار انجام گرفت. همچنین حداقل غلظت کنترل‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌ها تعیین گردید. یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیشترین اثر ضدباکتریایی در غلظت ۴ mg/ml و ۱۰۰ mg/ml، مربوط به گیاه آویشن دنايي می‌باشد، همچنین در غلظت ۴ mg/ml، کمترین اثر متعلق به گیاه پونه می‌باشد. در غلظت ۱ mg/ml، بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به گیاهان نعنای، پونه و رازیانه بود. باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* بیشترین حساسیت را به اسانس آویشن دنايي با حداقل غلظت کنترل‌کنندگی ۰/۱۲۲ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی ۰/۲۴۵ mg/ml و باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 بیشترین حساسیت را به اسانس رازیانه با حداقل غلظت کنترل‌کنندگی ۱/۹۵ mg/ml و حداقل غلظت کشندگی ۳/۹۰ mg/ml نشان دادند.

**واژه‌های کلیدی:** اسانس، حداقل غلظت کشندگی، حداقل غلظت کنترل‌کنندگی، فعالیت ضدباکتریایی، گیاهان دارویی.**Antibacterial effect of some essential oils on rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv.*****oryzae* and non pathogenic bacteria *Pseudomonas fluorescens* CHA0**Behrokh Shabani<sup>1</sup>, Rasool Rezaei<sup>2\*</sup>, Habiballah Charehgani<sup>3</sup>, Amin Salehi<sup>4</sup>

1. Former MS.c. Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Iran.

2 and 3. Assistant Professors, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Iran.

4. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Yasouj University, Iran.

(Received: February 4, 2018 - Accepted: March 1, 2018)

**ABSTRACT**

Bacterial blight disease of rice, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, is one of the most important diseases of rice worldwide. Incidence of this disease has been reported in Iran. In present study, antibacterial effects of some medicinal plants of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province on this bacterium as well as on *Pseudomonas fluorescens* CHA0 was investigated. Antimicrobial effect of essential oils of *Thymus daenensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha spicata*, *Mentha piperita* and *Pelargonum graveolens* was determined by agar diffusion method, under laboratory condition. Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal bactericide concentration (MBC) of essential oils were also determined. The results showed that, at the concentrations of 4 and 100 mg/ml, the essential oil of *T. daenensis* had the highest antibacterial effect and at the concentration of 4 mg/ml, *Mentha spicata* had the lowest antibacterial effect. At the concentration of 1 mg/ml, essential oils of *Mentha piperita*, *Mentha spicata* and *Foeniculum vulgare* showed the most antibacterial activity. It was found that *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* was the most sensitive to *Thymus daenensis* with MIC of 0.122 mg/ml and MBC of 0.245 mg/ml, while *Pseudomonas fluorescens* CHA0 was the most sensitive to *Foeniculum vulgare* with MIC of 1.95 mg/ml and MBC of 3.90 mg/ml.

**Keywords:** Essence, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration, Antibacterial activity, Medicinal plants.

\* Corresponding author E-mail: rrezaei@yu.ac.ir

## تازه‌های تحقیق

در تحقیق حاضر اثرات ضدباکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی موجود در طبیعت ایران، از جمله آویشن دناپی، رزماری، رازیانه، پونه، نعنای و شمعدانی معطر بر روی عامل بیماری بلایت باکتریایی *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* مورد بررسی قرار گرفته است. این تحقیق اولین مطالعه در خصوص اثر ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی بر این باکتری در ایران می‌باشد.

## مقدمه

بیماری بلایت باکتریایی برنج با عامل *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های برنج در جهان می‌باشد و بیشتر در نواحی گرمسیری خسارت وارد می‌کند (Dinh et al. 2008). این بیماری در ایران از شمال کشور گزارش شده است (Khoshkdaman et al. 2009). از روش‌های کنترلی که تا به امروز برای کاهش خسارت بیماری استفاده شده است می‌توان به استفاده از ارقام مقاوم، ضدعفونی بذور با ترکیبات ضد میکروبی، کاربرد سموم سیستمیک مانند کلرامفنیکول و نیکلوزامید (Kim et al. 2016) و استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست اشاره نمود. استفاده از روش‌های کنترلی جایگزین سموم شامل کنترل زیستی و استفاده از گیاهان دارویی با خاصیت ضد میکروبی، در حال توسعه می‌باشند. کاربرد اسانس‌های گیاهان دارویی علاوه بر توانایی کنترل

بیماری‌های گیاهی، باعث کاهش هزینه‌ها شده و از برهم خوردن تعادل اکولوژیکی محیط زیست ممانعت می‌کند (Jabeen et al. 2009). از این رو در این تحقیق سعی شده اثرات ضدباکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی موجود در طبیعت ایران، از جمله آویشن دناپی، رزماری، رازیانه، پونه، نعنای و شمعدانی معطر جهت تعیین میزان کارایی آن‌ها بر روی عامل بیماری بلایت باکتریایی برنج، مورد بررسی قرار گیرد، تا بتوان در صورت امکان جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی تهیه نمود.

## مواد و روش‌ها

### باکتری‌های مورد استفاده

سویه بیمارگر باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* و *Pseudomonas fluorescens* CHA0 از بخش گیاه پزشکی دانشگاه شیراز دریافت و برای انجام تحقیقات مورد استفاده قرار گرفت.

### تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی جهت اسانس‌گیری

نمونه‌های گیاهی از استان کهگیلویه و بویراحمد تهیه و در سایه و در شرایط آزمایشگاهی خشک شدند (جدول ۱). برای استخراج اسانس‌ها از روش تقطیر با آب به وسیله دستگاه تقطیر گردشی (کلونجر) استفاده شد.

جدول ۱. گیاهان مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Medicinal plants used in this study

Scientific name	Parts used	Family
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Flower, Leaf	Lamiaceae
<i>Thymus daenensi</i>	Leaf, Stem	Lamiaceae
<i>Foeniculum vulgare</i>	Leaf, Stem	Apiaceae
<i>Mentha spicata</i>	Leaf, Stem	Lamiaceae
<i>Mentha piperita</i>	Leaf, Stem	Lamiaceae
<i>Pelargonium graveolens</i>	Flower, Leaf	Geraniaceae

Nutrient Broth (NB) آگار ریخته و به وسیله لوله L شکل به طور کامل پخش گردید. بعد از خشک شدن سطح محیط، غلظت‌های مناسبی از اسانس‌های گیاهان را روی دیسک‌های کاغذی سترون به قطر ۶ میلی‌متر ریخته، به طوری که سطح دیسک‌های کاغذی

بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف در

شرایط آزمایشگاه

روش نشر در آگار

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری حاوی ۱۰<sup>۶</sup>cfu/ml سلول باکتری، روی محیط کشت

*oryzae* (جدایه برنج) اثر ضدباکتریایی داشتند. بیشترین اثر ضدباکتریایی بر روی *P. fluorescens* در غلظت ۱۰۰mg/ml مربوط به گیاه رازیانه بود. در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اسانس گیاهان مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند. در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، هیچکدام از اسانس‌های گیاهی اختلاف معنی‌داری با دیسک حاوی جنتامایسین در بازدارندگی از رشد باکتری نشان ندادند ( $P=0.01$ ) (شکل ۱). بیشترین اثر ضدباکتریایی روی باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در غلظت ۱۰۰mg/ml، مربوط به گیاه آویشن دنیایی و کمترین اثر ضدباکتریایی مربوط به گیاه رازیانه بود. همچنین در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بیشترین اثر مربوط به گیاه آویشن دنیایی و کمترین اثر متعلق به گیاه پونه و رزماری بود. در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، کمترین اثر ضدباکتریایی مربوط به گیاه رزماری بود. سایر اسانس‌های گیاهی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ( $P=0.01$ ) (شکل ۲).

کاملاً با اسانس آغشته شد. همچنین از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) به‌عنوان شاهد مثبت و دیسک حاوی ۱۵ میکرولیتر آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید. بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت هاله بازدارنده اطراف دیسک‌های کاغذی مشاهده گردید و با خط‌کش برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری انجام گرفت.

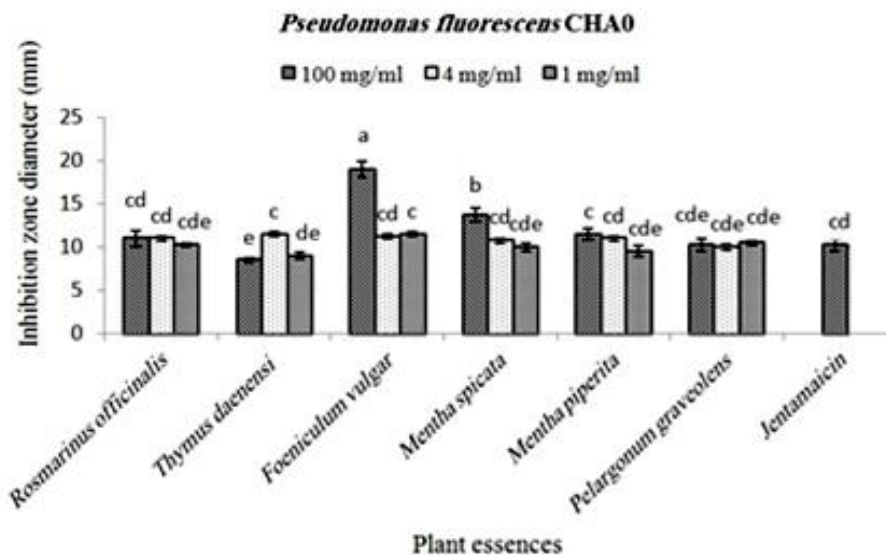
### تعیین حداقل غلظت کنترل‌کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت کنترل‌کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration) اسانس، از روش سری دو برابر رقت لوله‌ای در محیط کشت مغذی استفاده شد.

### نتایج و بحث

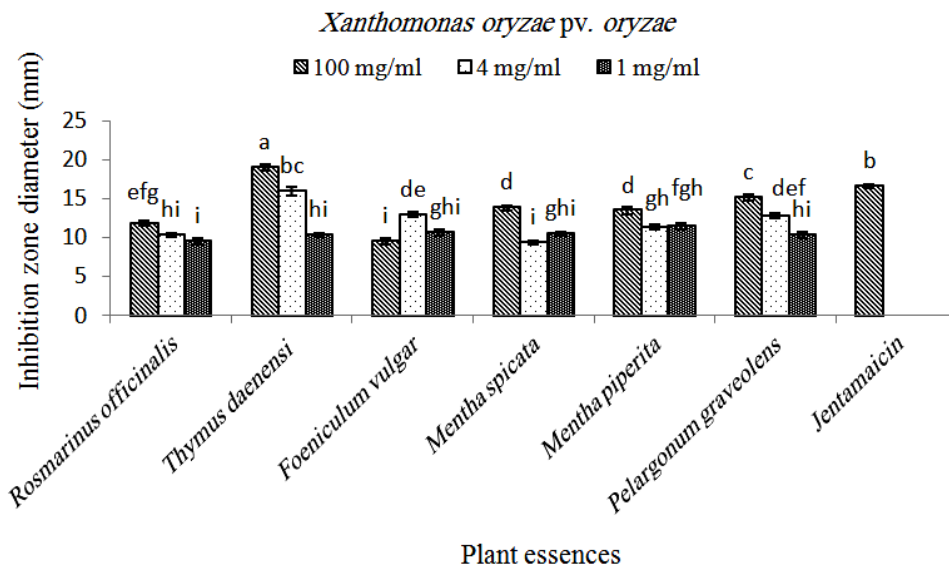
#### بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف در شرایط آزمایشگاه

کلیه اسانس‌های گیاهی مورد استفاده بر روی باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. و *P. fluorescens* CHA0



شکل ۱. مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده ایجاد شده توسط اسانس‌های مورد استفاده علیه باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 در شرایط آزمایشگاه. (حروف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد).

Figure 1. Mean comparison of inhibition zone diameter produced by essential oils used against *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in laboratory conditions. (For each column, the data followed with the same letter were not statistically different)



شکل ۲. مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده ایجاد شده توسط اسانس‌های مورد استفاده علیه باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در شرایط آزمایشگاه. (حروف مشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد).

Figure 2. Mean comparison of inhibition zone diameter produced by essential oils used against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in laboratory conditions. (For each column, the data followed with the same letter were not statistically different)

غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دارای حداقل غلظت کنترل‌کنندگی نسبت به سایر تیمارها بود (جدول ۲). همچنین اسانس‌های مختلف در غلظت‌های مختلف بر روی باکتری *P. fluorescens* CHA0 اثر بازدارندگی داشتند. اسانس رازیانه با غلظت ۳/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای کمترین غلظت و بالاترین اثر باکتری‌کشی و با غلظت ۱/۹۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای حداقل غلظت کنترل‌کنندگی بود (جدول ۳).

#### حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

اسانس‌های مختلف در غلظت‌های مختلف بر روی باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* اثر بازدارندگی داشتند. اسانس آویشن دنایی با غلظت ۰/۲۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دارای کمترین غلظت و بالاترین اثر باکتری‌کشی و با غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، دارای حداقل غلظت کنترل‌کنندگی بود و اسانس رازیانه با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین غلظت و کمترین اثر باکتری‌کشی و با

جدول ۲. اثر ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف مورد استفاده در این تحقیق بر روی باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در شرایط آزمایشگاه

Table 2. *In vitro* antibacterial effect of different essences used in this study on *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

Plant	Minimum bactericidal concentration (mg/ml)	Minimum inhibitory concentration (mg/ml)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	15.63	7.8
<i>Thymus daenensi</i>	0.245	0.122
<i>Foeniculum vulgare</i>	125	62.5
<i>Mentha spicata</i>	0.98	0.49
<i>Mentha piperita</i>	15.63	7.8
<i>Pelargonium graveolens</i>	7.8	3.9

جدول ۳. اثر ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف مورد استفاده در این تحقیق بر روی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 در شرایط آزمایشگاه

Table 3. *In vitro* antibacterial effect of different essences used in this study on *Pseudomonas fluorescens* CHA0

Plant	Minimum bactericidal concentration (mg/ml)	Minimum inhibitory concentration (mg/ml)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	250	125
<i>Thymus daenensi</i>	250	125
<i>Foeniculum vulgare</i>	3.9	1.95
<i>Mentha spicata</i>	7.8	3.9
<i>Mentha piperita</i>	250	125
<i>Pelargonum graveolens</i>	7.8	3.9

#### REFERENCES

- Dinh HD, Oanh NK, Toan ND, Du PV, Loan LC** (2008) Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* isolated from the rice ecosystem in Cuulong river delta. *Omorice* 16: 34-40.
- Jabeen R, Ashraf M, Ahmad I** (2009) Evaluating the effects of cold water diffusates against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial leaf blight in rice. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42(2): 137 – 187.
- Khoshkdaman M, Niknejad kazmpour M, Ebadi AA, Pedramfar H** (2009) Identification of causal agent of bacterial bight of rice in the fields of Guilan province. *Journal of Plant Protection* 23(1): 50-57. (In Persian).
- Kim SI, Song JT, Jeong JY, Seo HS** (2016) Niclosamide inhibits leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* in rice. *Scientific Reports* 6: 21209.