بازدارندگی، باکتری ایستایی و کشندگی عصاره‌ی متانولی چهار گونه گلسنگ بومی ایران بر چند باکتری بیماری‌زای گیاهی

سلیمان جمشیدی و سیده مریم شهیدی

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد میانه، ایران.

مسئول مکاتبات: سلیمان جمشیدی، پست الکترونیک: s.jamshidi@m-iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۱۲ ۲ (۲) ۲۵-۳۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۸

چکیده

بیماری‌های گیاهی از مهمترین عوامل محدودکننده‌ی عمده در کشاورزی محسوب می‌شوند که هر ساله بخش قابل توجهی از تولیدات گیاهی را از بین می‌برند. خطرات و تهدیدهای ناشی از استفاده مکرر و بی‌رویه از آفت‌کش‌های شیمیایی برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی، سبب توجه ویژه به ترکیبات طبیعی، امن و دوستدار محیط زیست شده است. گلسنگ‌ها به سبب برخورداری از مواد ضدمیکروبی فراوان در سال‌های اخیر، به‌عنوان یکی از مناسب‌ترین منابع ترکیبات طبیعی جایگزین مطرح شده‌اند. در این پژوهش اثر بازدارندگی و کشندگی عصاره‌ی متانولی چهارگونه گلسنگ جمع‌آوری شده از منطقه‌ی ارسباران، آذربایجان شرقی شامل *Pleopsidium gobiensis*، *Parmelina tiliacea*، *Anaptychia setifera* و *Lecanora argopholis* روی چند باکتری بیماری‌زای گیاهی نظیر *Pectobacterium atrosepticum*، *Pseudomonas syringe* pv. *syringae*، *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* و *Rhizobium tumefaciens* با روش نشر در آگار و نیز روش اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارنده و کشنده مورد ارزیابی قرار گرفت. همه‌ی عصاره‌های گلسنگی بر هر چهار باکتری اثر کشنده و بازدارنده داشتند. با این حال، باکتری *R. tumefaciens* حساسیتی زیادی به این ترکیبات در مقایسه با سایر باکتری‌ها نشان نداد. در روش نشر در آگار، عصاره‌ی متانولی گلسنگ *P. gobiensis* توانست با استرپتومایسین در بازدارندگی از رشد باکتری *P. s.* pv. *syringae* برابری کند. باکتری *P. atrosepticum* و *X. a.* pv. *juglandis* حساسیت بالایی به ترکیبات گلسنگی و استرپتومایسین نشان دادند. کشنده‌ترین عصاره‌ی متانولی مربوط به گلسنگ *P. gobiensis* بر باکتری *X. a.* pv. *juglandis* و عصاره‌ی گلسنگ *P. tiliacea* بر باکتری *P. atrocepticum* با میزان کشندگی ۲/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند. با توجه به نتایج این مطالعه به‌نظر می‌رسد عصاره‌های گلسنگی از کارآیی قابل ملاحظه‌ای برای مهار باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی داشته و در آینده می‌بایست مورد مطالعه‌ی بیشتری قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: باکتری، گلسنگ، مهار زیستی، فعالیت ضدباکتریایی، ترکیبات طبیعی، حداقل غلظت بازدارنده و کشنده

مقدمه

بیماری‌های گیاهی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده‌ی محصولات کشاورزی هستند که هر ساله بخش قابل توجهی از فرآورده‌های گیاهی را از بین می‌برند (Strange & Scott, 2005). استفاده مکرر و بی‌رویه از ترکیبات شیمیایی برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی، علاوه بر آلودگی محیط‌زیست، موجب بروز پدیده مقاومت عوامل بیماری‌زا به آفت‌کش‌ها شده و خسارت عوامل بیماری‌زای گیاهی را افزایش و سلامتی بشر را نیز تهدید می‌کنند (Afzal *et al.*, 1997). اکثر آفت‌کش‌های گیاهی، ساخته دست بشر و شیمیایی هستند و متأسفانه اغلب رویکردهای اتخاذ شده در کشاورزی یکی دو قرن اخیر با کشاورزی پایدار مغایرت دارد (Narayanasamy, 2002). امروزه مهارزیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با هدف کاهش تهدیدات زیست‌محیطی و مخاطرات آفت‌کش‌های شیمیایی یک اولویت می‌باشد. در این راستا، استفاده از کارآیی

ضدمیکروبی مواد گیاهی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته و استفاده از ترکیبات گیاهی و طبیعی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی، یکی از راه‌کارهای کاهش مخاطرات زیست محیطی است (Afzal *et al.,* 1997). گلسنگ‌ها زیست‌بوم‌های کوچکی هستند که مشتمل بر هم‌زیستی دو موجود قارچ و جلبک می‌باشند. این موجودات از مهم‌ترین منابع منحصر به فرد شناخته شده‌ای هستند که دارای تولیدات طبیعی شامل مواد بیوشیمیایی مختلف مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها، ترکیبات فنلی و رنگدانه‌ها با خواص دارویی و ضدمیکروبی هستند (Ahmadjian & Hale, 1973; Elix & Stocker-Worgotter, 2008). بخش قارچی گلسنگ‌ها، قادر است انواع مختلفی از ترکیبات آلی و بیوشیمیایی را تولید نمایند که اغلب ارزش چندانی در تأمین انرژی لازم برای بقا و ساخت اجزای سلولی گلسنگ‌ها ندارد و تولیدات ثانویه و حدواسطی به‌شمار می‌روند که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در سوخت و ساز سلولی مؤثرند (Nash, 1996). این ترکیبات به لحاظ دارا بودن خاصیت آنتی‌بیوتیک، مسؤول حفاظت گلسنگ در مقابل حمله‌ی باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشند که از این خاصیت علیه عوامل بیماری‌زا استفاده می‌گردد (Boustie & Grube, 2005; Nash, 1996). ترکیبات متعدد آلی در گونه‌های مختلف گلسنگ‌ها وجود دارد که برای موجوداتی مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها سمی بوده و سبب کشندگی یا بازدارندگی رشد آن‌ها می‌گردد (Romagni *et al*., 2004). مطالعه روی آنتی‌بیوتیک‌های استخراج شده از گلسنگ‌ها توسط بورک‌هولدر و همکاران (Burkholder *et al*., 1994) آغاز شد. از آن زمان تا به امروز آنتی‌بیوتیک‌های بی‌نظیری از گلسنگ‌ها کشف شده که روی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مؤثر بوده‌اند (Ahmadjian & Hale, 1973; Burkholder, *et al.* 1944; Alexopoulos, 1996). ساتی و جوشی (Sati & Joshi, 2011) با بررسی فعالیت ضد باکتری عصاره‌های متانولی، اتانولی، کلروفرمی و آبی گلسنگ *Parmotrema ailgherrense* برابر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و انسانی از جمله *Bacillus subtilis*، *Erwinia chrysanthemi*، *Escherichia coli*، *Rhizobium tumefaciens* و *Xanthomonas phaseoli* گزارش کردند که تمام عصاره‌های گلسنگ مذکور مقابل باکتری‌های مورد مطالعه دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشند. فعالیت ضدمیکروبی گلسنگ *Parmelia perlata* روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی مثل *Clavibacter michiganensis* و *Ralstonia solanacearum* و قارچ *Fusarium oxysporum* و *Rhizopus nigricans* گزارش شده است (Thippeswamy *et al.,* 2012). بررسی اثر عصاره‌های کلروفورمی، استونی، دی‌اتیل‌اتری و متانولی گلسنگ‌های *Pleopsidium gobiensis*، *Parmelina tiliacea*، *Anaptychia setifera* و *Lecanora argopholis* روی باکتری‌های پوسیدگی نرم سیب زمینی نشان داد که باکتری *Pectobacterium cartovorum* pv. *cartovorum* به این ترکیبات حساس و *R. solanacearum* مقاوم است (Shahidi *et al*., 2013a). عصاره‌ی متانولی گلسنگ *R. sinensis* در مقابل باکتری *P. caratovorum* pv. *caratovorum* با ایجاد هاله‌ی بازدارنده ۱۶/۶ میلی‌متری و حداقل غلظت بازدارنده و کشنده به‌ترتیب ۲/۱۹ و ۴/۳۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، مؤثرترین تیمار گلسنگی بود که اثر آن حتی از تتراسایکلین و استرپتومایسین نیز بهتر بود (Shahidi *et al*., 2013b). در مجموع، گلسنگ‌های *P. tiliacea* و *R. sinensis* بیشترین اثر بازدارندگی را بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشتند (Shahidi *et al*., 2013c). همچنین با بررسی اثر عصاره‌های استونی، متانولی کلروفورمی ۵ گونه گلسنگ *Ramalina capitaat*، *Xanthoparmelia stenophylla*، *Rhizoplaca crysoleuca*، *Umbilicaria cylindrica* جمع‌آوری شده از منطقه‌ی مشکین شهر و *Anamylopsora pulcherrima* از منطقه داران جلفا، نشان داد که این گلسنگ‌ها روی گونه‌های *Fusarium* عامل پوسیدگی خشک سیب زمینی بی اثرند ولی روی باکتری *P. caratovorum* pv. *caratovorum* مؤثر بودند (Houshyar *et al*., 2014).

در این تحقیق اثر بازدارندگی عصاره‌ی متانولی چهار گونه گلسنگ بومی شمال غرب ایران روی چند گونه باکتری در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

۱ – جمع‌آوری گلسنگ‌ها و عصاره‌گیری

نمونه‌های گلسنگی در اردیبهشت سال ۱۳۹۱ براساس فراوانی در منطقه و نیز سابقه‌ی باکتری‌کشی ذکر شده در منابع از ارسباران، آذربایجان شرقی جمع‌آوری و درون پاکت‌های کاغذی پس از درج مشخصات نمونه، به آزمایشگاه منتقل گردید (جدول ۱). شناسایی گلسنگ‌ها توسط دکتر سهرابی استادیار سازمان پژوهش‌های صنعتی کشور متخصص گلسنگ‌شناسی انجام شد. گلسنگ‌ها با آب مقطر سترون داخل الک‌های معمولی شسته شده و در تاریکی با دمای معمولی آزمایشگاه خشک شدند. سپس گلسنگ‌ها با استفاده از آسیاب برقی (Moulinex Co., France) به‌صورت پودر درآمدند.

جدول ۱- اسامی، نوع بستر و مشخصات جغرافیایی گلسنگ‌های مورد مطالعه.

Table 1- Geographic characteristics of collected lichens and their natural substrates.

Lichen	acronym	substrate	region	longitude	latitude	altitude (m)
Parmelina tiliacea	*Pa*	rock	Kolale	E″ 15′ 61 46°	N″ 77′ 88 38°	960
Anaptychia setifera	*As*	tree	Kolale	E″ 15′ 61 46°	N″ 05′ 87 38°	1350
Lecanora argopholis	*La*	rock	Kordasht	E″ 75′ 36 46°	N″ 88′ 90 38°	502
Pleopsidium gobiensis	*Pg*	rock	Kordasht	E″ 75′ 36 46°	N″ 88′ 90 38°	502

عصاره‌گیری با استفاده از حلال متانول (Merck Co., Germany) با دستگاه استخراج کننده‌ی سوکسوله (soxhlet extractor) انجام شد. به این ترتیب که ۱۰ گرم از پودر هر یک از گلسنگ‌ها داخل یک کاغذ صافی که به‌صورت مخروط ته بسته درست شده بود، ریخته شده و به مخزن سوکسله انتقال و ۲۵۰ میلی لیتر متانول در بالن ریخته‌شد (Samsam Shariat, 1992). حلال در اثر حرارت بخار و روی نمونه ریخته شد. این عمل به‌مدت ۵ ساعت ادامه یافته و عصاره‌ی غلیظ گلسنگ‌ها به‌دست آمد. برای جدا شدن حلال از عصاره از دستگاه روتاری (rotary evaporator) به‌همراه پمپ خلاء (Laboratoa 4010 Digital, Heidolph Co., Germany) استفاده شد (Samsam Shariat, 2007). عصاره داخل بالن خشک و سترون دستگاه روتاری ریخته شده و در دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه‌ی سلسیوس تحت خلاء قرار گرفت. به این ترتیب حلال از عصاره‌ی خشک جدا شده و عصاره‌ی غلیظ به‌دست‌آمده و در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس تا انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی نگهداری شد (Momeni *et al*., 2011).

۲ – تهیه سوسپانسیون باکتریایی

جدایه بیماری‌زای باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*، *Pectobacterium atrosepticum*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* و *Rhizobium tumefaciens* از مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور دریافت و به محیط کشت آگار مغذی منتقل شدند. محیط‌های کشت مایه‌زنی شده در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند (جدول ۲).

جدول ۲ – مشخصات باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی مورد مطالعه.

Table 2- Characters of the studied plant pathogenic bacteria.

Bacteria	code	host	collection site
P. s. pv. *syringae*	5	*Prunus persica*	Behshahr, Iran
P. atrocepticum	1007	*Solanum tuberosum*	Netherlands
X. a. pv. *juglandis*	10	*Juglans regia*	Khorram Abad, Iran
R. tumefaciens	q8	*Vitis vinifera*	Qazvin, Iran

۳ - آزمون دیسک و انتشار در آگار

برای انجام آزمون ضدباکتریایی از محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller Hinton agar) (Merck Co., Germany) استفاده شد. مایه‌ی تلقیح اولیه باکتری‌های مورد بررسی تهیه و یک تک کلون باکتری به‌وسیله‌ی سوزن سترون برداشته و در سرم فیزیولوژیک سترون حل شد. سوسپانسیون باکتری با رقت $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر به‌روش مقایسه با شماره نیم استاندارد مک‌فارلند (McFarland standard) تهیه شد (Rankovic *et al.*, 2010). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط منعقد شده ریخته و به‌وسیله‌ی پیپت پاستور سترون، به‌طور کامل روی محیط پخش شد و برای مدت ۲۰-۲۵ دقیقه بدون در، زیر هود سترون قرار گرفت تا محیط کاملاً خشک شود. مقدار ۳۵ میلی‌گرم از عصاره‌ی غلیظ گلسنگ در ۱ میلی‌لیتر حلال خنثی دی‌متیل‌سولفوکسید (dimethyl sulfoxide (DMSO)) حل و با استفاده از سرنگ فیلتر ۰/۲۲ میکرون سترون شد. به این ترتیب غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی گلسنگ به‌دست آمد. روی هرکدام از دیسک‌ها مقدار ۱۵ میکرولیتر از عصاره‌ی گلسنگ‌ها ریخته شد و آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و استرپتومایسین به‌صورت آماده ساخت شرکت پادتن طب به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. همچنین برای شاهد منفی نیز مقدار ۱۵ میکرولیتر از حلال دی‌متیل‌سولفوکسید به دیسک‌ها اضافه شد. دیسک‌های فوق روی تشتک‌های پتری سترون شده برای مدت ۱۰ دقیقه در زیر هود قرار گرفت تا کاملاً خشک شوند، سپس در فاصله‌ی معین و در سه تکرار روی محیط کشت قرار داده شدند. تشتک‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس داخل انکوباتور قرار داده شد و قطر هاله عدم رشد باکتری اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Modarresi Chardahi *et al.*, 2012).

٤ - آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارنده (Minimal Inhibitory Concentration (MIC)) و کشنده (Minimal Bactericidal Concentration (MBC))

در آزمون حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد و کشنده از محیط کشت مولر هینتون براث (Muller-Hinton broth) (۲۱ گرم در لیتر) استفاده شد. برای تهیه‌ی غلظت اولیه عصاره‌ی گلسنگ از ۹۰ میلی‌گرم عصاره‌ی خشک در یک میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکسید استفاده شد (Ahmadjian & Hale, 1973). در این بخش از نه لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر از محیط کشت استفاده شد. یکی از لوله‌های آزمایش به‌عنوان شاهد مثبت حاوی فقط محیط کشت و باکتری و لوله آزمایش دیگر به‌عنوان شاهد منفی حاوی فقط محیط کشت انتخاب شد. هفت لوله آزمایش باقی مانده از شماره ۱ تا ۷ شماره‌گذاری گردید. در داخل لوله شماره ۱، ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ی گلسنگ با غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته شد، به‌وسیله‌ی شیکر لوله به‌مدت ۱ دقیقه یکنواخت شد. از لوله آزمایش شماره‌ی ۱، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول هموژن به‌وسیله‌ی سمپلر برداشته شده و داخل لوله شماره‌ی ۲ ریخته شد و این کار تا لوله‌ی شماره ۷ تکرار شد و از لوله‌ی شماره ۷، ۱ میلی‌لیتر از محلول هموژن محیط کشت مایع و عصاره‌ی گلسنگ برداشته و به بیرون منتقل گردید. بدین ترتیب غلظت‌های ۴۵، ۲۲/۵، ۱۱/۲۵، ۵/۶۲، ۲/۸، ۱/۴ و ۰/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های گلسنگی به‌دست آمد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با رقت مذکور داخل تمام لوله‌ها به جز لوله شاهد منفی ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری و سپس رشد یا عدم رشد باکتری‌ها به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. تیماری که در آن رشدی از باکتری قابل مشاهده نبود، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده از رشد در نظرگرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشنده، از سری رقت تهیه شده با روش قبلی، ۱۰ میکرولیتر برداشته و به‌محیط کشت جامد مولر هینتون آگار انتقال داده شد و در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس، به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. کمترین رقت که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد.

۵ - طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های آزمون انتشار در آگار به‌صورت آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملاً با سه تکرار با نرم افزار SAS ver. 9.1 تجزیه‌ی واریانس و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج

آزمون انتشار در آگار

بین عصاره‌های گلسنگی مورد بررسی، همچنین باکتری‌ها و نیز اثر متقابل آن‌ها از نظر قطر هاله‌ی بازدارنده ایجاد شده در پرگنه باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ مشاهده شد (ضریب تغییرات: ۱۴/۲۱٪). در مجموع، عصاره‌های گلسنگی اثر بسیار متفاوتی بر باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان دادند. باکتری‌های *X. a.* pv. *juglandis* و *P. atrosepticum* حساسیت بیشتری به عصاره‌های گلسنگی و استرپتومایسین نشان دادند در حالی که باکتری *R. tumefaciens* بیشترین مقاومت را به این ترکیبات نشان داد و حساسیت *P. s.* pv. *syringae* به تیمارهای مورد مطالعه در حد متوسط بود. باکتری *R. tumefaciens* مقاومت زیادی به تیمارها نشان داد به‌طوری‌که حتی استرپتومایسین نتوانست بازدارندگی از رشد آن را سبب شود. تنها *P. gobiensis* و *P. tiliacea* توانستند تا حدی روی این باکتری اثرگذار باشند که البته اختلاف آن‌ها از لحاظ قطر هاله ایجاد شده در پرگنه باکتری با شاهد معنی‌دار نبود. استرپتومایسین تنها روی این باکتری نتوانست اثر بازدارنده داشته باشد و این باکتری در مجموع تأثیر قابل توجهی از هیچ یک از عصاره‌های گلسنگی نگرفت. از لحاظ اثر بازدارنده بر رشد باکتری *X. a.* pv. *juglandis* و *P. atrosepticum* هیچ یک از عصاره‌های متانولی گلسنگ‌ها نتوانستند با استرپتومایسین رقابت کنند. از لحاظ اثر بر باکتری *P. s.* pv. *syringae* عصاره‌های متانولی گلسنگ‌ها به جز *A. setifera* و *P. tiliacae* بر این باکتری بازدارنده بودند. سایر عصاره‌های گلسنگی بر باکتری *P. s.* pv. *syringae* اثر بازدارنده نشان دادند و اختلاف آن‌ها با شاهد منفی معنی‌دار بود و حتی عصاره‌ی متانولی گلسنگ *P. gobiensis* و *L. argopholis* از نظر بازدارندگی رشد باکتری *P. s. pv. syringae* از لحاظ آماری توانست با اثر استرپتومایسین رقابت کند. عصاره‌ی متانولی گلسنگ‌ها به جز گلسنگ *L. argopholis* اثر یکسانی بر بازدارندگی رشد *X. a.* pv. *juglandis* داشتند که با شاهد منفی و مثبت اختلاف‌شان معنی‌دار بود و عصاره‌ی گلسنگی *L. argopholis* بر این باکتری ضعیف‌ترین تیمار مورد مطالعه بود. با این حال، تمام عصاره‌های گلسنگی توانستند بر این باکتری مؤثر بوده و اختلاف‌شان با شاهد منفی معنی‌دار بود. همچنین تمام تیمارهای گلسنگی بر *P. atrosepticum* اثرگذار بودند ولی هیچ‌کدام نتوانستند با استرپتومایسین در این زمینه رقابت داشته باشند. اثرگذارترین تیمار گلسنگی مربوط به عصاره‌ی متانولی *L. argopholis* و *P. gobiensis* بود. کم اثرترین تیمار گلسنگی روی باکتری *P. atrosepticum*، عصاره‌ی گلسنگی *A. setifera* و *P. tiliacea* بود. در کل، به‌نظر می‌رسد گلسنگ‌های *P. gobiensis* و *L. argopholis* از توانایی بیشتری در متوقف نمودن رشد باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به سایرین برخوردار است (جدول ۳).

حداقل بازدارندگی رشد و کشندگی عصاره‌ها

تمام عصاره‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف اثر کشندگی و بازدارندگی بر باکتری‌های مورد مطالعه نشان دادند. با این حال، حداقل بازدارندگی عصاره‌ی متانولی *gobiensis* بر *X. a.* pv. *juglandis* از همه بیشتر بود. عصاره‌های گلسنگی در بالاترین غلظت‌ها بر *R. tumefaciens* بازدارنده و کشنده بودند و این حاکی از مقاومت این باکتری برابر عصاره‌های گلسنگی است. همچنین غلظت‌های دو برابر حداقل بازدارنده تمام عصاره‌های گلسنگی به‌جز *L. argopholis* بر این باکتری کشنده بودند. عصاره همین گلسنگ بازدارندگی بیشتری مقابل *R. tumefaciens* نسبت به سایر گلسنگ‌ها از خود نشان داد، در حالی که عصاره‌های متانولی گلسنگی همگی در یک غلظت (۴۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برابر این باکتری کشنده بودند. همچنین باکتری *P. s.* pv. *syringae* نیز نسبت به کشندگی مقاومتی برابر با *R. tumefaciens* به

عصاره‌های *P. gobiensis* و *A. setifera* نشان داد، همچنین غلظت‌های بالایی از عصاره همین دو گلسنگ و نیز *P. tiliacea* توانست بر *P. s.* pv. *syringae* بازدارنده باشد، در حالی که عصاره‌ی *L. argopholis* به‌شدت بازدارنده و نیز کشنده‌تر از سایرین بر *P. s.* pv. *syringae* بودند. عصاره‌های متانولی گلسنگ‌ها به‌شدت بر *P. atrosepticum* و در درجه‌ی دوم بر *X. a.* pv. *juglandis* اثر بازدارنده و کشنده داشتند. با این حال، کشندگی *P. gobiensis* بر *P. atrosepticum* و *L. argopholis* از بقیه ضعیف‌تر بود. کشنده‌ترین ترکیبات *P. gobiensis* روی *X. a.* pv. *juglandis* و *P. tiliacea* بر *P. atrosepticum* بودند (جدول ۴).

جدول ۳- مقایسه‌ی میانگین قطر هاله بازدارنده ایجاد شده توسط عصاره‌ی متانولی گلسنگ‌های مختلف بر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی.

Table 3- Inhibition zone diameter caused by lichen treatments application in plant pathogenic bacteri.

Lichens	inhibition zone diameter (mm)			
	P. s. pv. *syringae*	*X. a.* pv. *juglandis*	*P. atrosepticum*	*R. tumefaciens*
P. tiliacea	9.5 $^{g-j}$	19.7 ^{cde}	15.3 ^{ef}	7.8 ^{hij}
P. gobiensis	14.7 ^{f}	20.2 ^{bcd}	22.3 ^{bc}	7.3 ^{ij}
L. argopholis	11.5 $^{f-i}$	13.7 ^{fg}	24.3 ^{b}	6.4 ^{j}
A. setifera	6.4 ^{j}	15.8 ^{def}	12.2 ^{fg}	6.4 ^{j}
Streptomycin	15.0 ^{f}	31.7 ^{a}	31.3 ^{a}	6.4 ^{j}
Control	6.4 ^{j}	6.4 ^{j}	6.4 ^{j}	6.4 ^{j}

میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

The columns with common lable letters have no significant difference at 5% probability level

جدول ۴- حداقل غلظت بازدارنده از رشد، حداقل غلظت کشنده و نسبت غلظت کشنده بر بازدارنده عصاره‌های متانولی گلسنگی روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی.

Table 4– Minimal inhibitory and bactericide concentration and their proportion of lichen methanol extracts on plant pathogenic bacteria.

Bacterium	Lichen	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
P. syringae pv. *syringae*	*P. gobiensis*	11.25	45	4
	A. setifera	11.25	45	4
	L. argopholis	2.8	11.25	4
	P. tiliacea	11.25	22.5	2
P. atrosepticum	*P. gobiensis*	2.8	22.5	8
	A. setifera	2.8	5.62	2
	L. argopholis	1.4	5.62	4
	P. tiliacea	1.4	2.8	2
X. arboricola pv. *juglandis*	*P. gobiensis*	0.7	2.8	4
	A. setifera	5.62	11.25	2
	L. argopholis	2.8	22.5	8
	P. tiliacea	2.8	5.62	2
R. tumefaciens	*P. gobiensis*	22.5	45	2
	A. setifera	22.5	45	2
	L. argopholis	11.25	45	5
	P. tiliacea	22.5	45	2

بحث

گلسنگ‌ها و ترکیبات آن‌ها دارای چندین فعالیت بیولوژیکی نظیر خواص ضدویروسی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و نیز دارای آنزیم‌های مهار کننده‌ی رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Huneck, 1999; Aslan *et al*., 2001; Dulger *et al*., 1997). در این پژوهش نیز عصاره‌های متانولی گلسنگ‌های مورد بررسی کم و بیش فعالیت ضدباکتریایی مقابل باکتری های بیماری‌زای گیاهی مورد آزمایش نشان دادند هرچند این فعالیت برابر باکتری *R. tumefaciens* ضعیف بود و حساسیت این باکتری‌ها نیز به عصاره‌های گلسنگی یکسان نبود. همچنین گونه‌های مختلف گلسنگی، اثرات متفاوتی بر باکتری‌ها داشتند که این تفاوت می‌تواند به‌حضور و ترکیب مواد ضدباکتریایی در عصاره‌های مختلف گلسنگی عصاره‌ها مربوط باشد (Yilmaz *et al*., 2005; Rankovic *et al*., 2010). در تحقیق حاضر، برخی عصاره‌های متانولی گلسنگی توانستند از لحاظ بازدارندگی رشد برخی باکتری‌ها با استرپتومایسین رقابت نماید. این یافته، کارآیی بالقوه بالای عصاره‌ی متانولی این گلسنگ را برای مهار این باکتری نوید می‌دهد و با توجه به ناخالص بودن این عصاره از لحاظ ماده‌ی مؤثره موجود در آن و نیز خلوص استرپتومایسین به‌عنوان یک فرآورده تجاری می‌توان پس از شناسایی ماده‌ی مؤثره این گلسنگ نسبت به خالص‌سازی آن اقدام و برای تجاری سازی و فرموله کردن آن اقدامات بعدی را انجام داد. برخی پژوهش‌گران نیز گزارش کرده‌اند که اوسنیک اسید (usnic acid)به‌دست آمده از گلسنگ‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تری دارد (Rankovic *et al.,* 2010). در این بررسی، گلسنگ‌ها نتوانستند بر باکتری *R. tumefaciens* اثر بازدارنده و کشنده درخورتوجهی از خود نشان دهند. از طرف دیگر، آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین هم بر این باکتری مؤثر نبود که می‌تواند به این دلیل باشد که جدایه مقاومی از این باکتری به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در این تحقیق مورد استفاده قرارگرفته‌است. مقاومت به استرپتومایسین در این باکتری توسط کلپویجک و همکاران نیز گزارش شده است (Klapwijk *et al*., 1980). ساتی و جوشی (Sati & Joshi, 2011) فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی گلسنگ *Parmotrema ailgherrense* در مقابل باکتری *R. tumefaciens* به اثبات رسانده‌اند. در این بررسی عصاره‌های متانولی تمام گلسنگ‌ها تأثیر بالقوه‌ای در جلوگیری از رشد باکتری *P. atrosepticum* داشت که با توجه به انباری بودن بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی ناشی از این باکتری امکان استفاده از ترکیبات گلسنگی در شرایط انبار سهل الوصول‌تر از شرایط مزرعه‌ای و باغی در مورد سایر باکتری‌هاست. توصیه می‌شود آزمایش جامع انباری برای ارزیابی این ترکیبات در پیشگیری یا معالجه این بیماری در انبار صورت گیرد. همچنین، شهیدی و همکاران (Shahidi *et al.,* 2013a,b,c) عصاره‌ی متانولی این گلسنگ‌ها را برابر سایر باکتری‌های پوسیدگی انباری نظیر *P. carotovorum* pv. *carotovurim* و *D. chrysanthemi* و *R. solanacearum* بسیار مؤثر عنوان نموده‌اند. این عصاره‌ها در شرایط انبار نیز اثر امیدبخشی بر پیشگیری و درمان بیماری از خود نشان دادند. در پژوهشی، نشان داده شد که عصاره‌های گلسنگ *P. tiliacea* در مقابل باکتری‌های گرم منفی فاقد فعالیت بود (Aydin & Kinalioglu, 2010)، در حالی که در این مطالعه که روی باکتری‌های گرم منفی انجام شده، عصاره‌ی متانولی این گلسنگ، تأثیر خوبی بر باکتری‌های مورد مطالعه به‌ویژه *P. atrosepticum* و *X. a.* pv. *juglandis* از خود نشان داد. فعالیت ضدمیکروبی گلسنگ *Parmelia perlata* روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زای گیاهی نظیر *Clavibacter michiganensis* و *R. solanacearum* گزارش شده است (Thippeswamy *et al*., 2012). با توجه به نتایج به دست آمده آزمایش‌های تکمیلی در خصوص مشخص نمودن ماده مؤثره موجود در ترکیبات گلسنگی و نیز انجام آزمایش‌های ویژه شرایط طبیعی باغ و مزرعه و انبار می‌تواند در به ثمر رساندن و کاربردی نمودن این پژوهش کمک شایانی نماید. در نهایت، ترکیبات گلسنگی مورد مطالعه می‌توانند کارایی بالقوه‌ای در مهار باکتری‌های مورد

مطالعه داشته باشند و در آینده برای مهار زیستی این باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دکتر محمد سهرابی استادیار سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به جهت همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های گلسنگی و شناسایی آن‌ها، مهندس ابوالقاسم قاسمی عضو هیأت علمی مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، به جهت شناسایی و تحویل باکتری‌های مورد مطالعه و دکتر شهرام شاهرخی به لحاظ مساعدت در بخش تجزیه و تحلیل آماری این مقاله تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی به جهت تأمین اعتبار اجرای طرح پژوهشی سپاسگزاری می‌شود.

References

Afzal, A. M., Rahber-Bhatti, M. H. & Aslam, M. 1997. Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris* pv. *citri.* International Journal of Pest Management, 43: 149-153.

Ahmadjian, V. & Hale, M. E. 1973. Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. pp. 653–659. In: Ahmadjian, V. & Hale, M. E. (Eds.), The Lichens. Academic Press, London, United Kingdom.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. 1996. Introductory on Mycology. 4th edition. John Wiley. New York.

Aslan, A., Gulluce, M. & Atalan, E. 2001. A study of antimicrobial activity of some lichens. Bulletin of Pure Applied Science, 20: 23-26.

Aydin, S. & Kinaliogli, K. 2010. Antimicrobial activity of the lichen extracts of *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* and *P. tiliaceae*, The Black Sea Journal of Sciences Sonbahar, 1:30-38.

Boustie, J. & Grube, M. 2005. Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 3: 273-287.

Burkholder, P., Evansa, W., Mcveigh, I. & Thorntonh, K. 1944. Antibiotic activity of lichens. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State, 19: 250–255.

Dulger, B., Gucin, F., Kara, A. & Aslan, A. 1997. *Usnea florida* (L) Wig. Antimicrobial activity of lichen, Turkish Journal of Biology, 21: 103-108.

Elix, J. A. & Stocker-Wörgötter, E. 2008. Biochemistry and secondary metabolites. pp. 104-133. In*:* Nash, T. H. (ed.) III: Lichen Biology. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge UK.

Houshyar, F., Jamshidi, S. & Sorhrabi, M. 2014. Antibacterial potential of five lichen species on *Fusarium equiseti* and *Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora* potato rot agents in laboratory and storage condition. Proceeding of the 2nd National Conference Modern Topic in Agriculture. 21 May, Iran, Tehran.

Huneck, S. 1999. The Significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften, 86: 559-576.

Klapwijk, P. M., van Breukelenm, J., Korevaar, K., Ooms, G. & Schilperoort, R. A. 1980. Transposition of Tn 904 encoding streptomycin resistance into the octopine Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bacteriology, 141: 129-36.

Modarresi Chardahi, A. Ebrahim, D., Fariza Soleiman, S. & Abolhasani, F. 2012. The effect of alcoholic extracts of *Urtica dioica* L. on some gram positive and gram negative bacteria. Medicinal Plant Journal, 42: 98-104.

Momeni, A., Naseri, M., Kamal Nejad, M., Khoshzaban, F., Rajiyan, T., Esmaeil Zaeh Nami, H., Mansouri, S. & Zavieh, D. 2011. The effects of essential oils and extracts of 50 medicinal plants on standard strain of *Candida albicans* in laboratory condition. Medicinal Plant Journal, 38: 164-172.

Narayanasamy, P. 2002. Microbial Plant Pathogens and Crop Disease Management. CRC Press. Florida.

Nash, T. H. 1996. Lichen Biology. The second edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Rankovic, B., Rankovic, D., Kosanic, M. & Msric, D. 2010. Antioxidant and antibacterial properties of the lichens *Anaptychya ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*, Central European Journal of Biology, 5: 649-655.

Romagni, J. G., Rosell, R. C., Nanayakkara, N. P. D. & Dayan, F. E. 2004. Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. pp. 13-33. In: Macías, F. A., Galindo, J. C. G., Molinillo, J. M. G., Cutler, H. G. (eds.): Allelopathy, Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Samsam Shariat, H. 1992. Extraction of Active Ingredient of Medicinal Plants and their Identification and Evaluations Methods. Mani Publication, Tehran, Iran.

Samsam Shariat, H. 2007. Selected Medicinal Plants. Mani Publication, Tehran, Iran.

Sati, S. C. & Joshi, S. 2011. Antibacterial activity of the Himalayan lichen *Parmotrema nilgherrense* extracts, British Microbiology Research Journal, 1: 26-32.

Shahidi, S. M., Jamshidi, S. & Torabi, M. 2013a. Antibacterial potential of five lichen species derived from Arasbaran region on *Dikerya chryanthemi* potato in laboratory and storage condition. Modern Science of Sustainable Agricultural Journal, 8: 55-65.

Shahidi, S. M., Jamshidi, S. & Torabi, M. 2013b. Inhibitive effect of five lichen species different extracts on *Ralstonia solanacearum*. Proceeding of the 1st National Conference of Sustainable Development of Agriculture and Green Environment. 28 Februrary 2013, Hamedan, Iran, 9.

Shahidi, S. M., Jamshidi, S. & Torabi. 2013c. Antibacterial potential of five lichen species from Arasbaran region against *Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora* causing potato soft rot in laboratory and storage conditions Iranian Journal of Applied Plant Protection, 1: 307-318.

Strange, R. N. & Scott, P. R. 2005. Plant disease: A threat to global food security. Annual Review of Phytopathology, 43: 83-116.

Thippeswamy, B., Sushma, N. R. & Naveenkumar, K. J. 2010 Antimicrobial property of bioactive factor isolated from *Parmelia perlata.* International Multidisciplinary Research Journal, 2: 1-5.

Yilmaz, M., Tay, T., Kivanc, M., Turk, H. & Turk, A. S. 2005. The antibacterial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulisa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. Journal of Biosciences Zeitschrift für Naturforschung Section C, 60: 35-38.

Growth inhibition, bacteriostatic and bactericidal potential of four Iranian lichen species against some plant pathogenic bacteria

Soleiman Jamshidi and Seyyedeh Maryam Shahidi

Young Researchers and Elite Club, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.

Corresponding author: Soleiman Jamshidi, email: s.jamshidi@m-iau.ac.ir

Received: Sep., 03, 2014 **2 (2) 27-34** **Accepted: March. 09, 2015**

Abstract

Plant diseases are one of the main limitations in crop production which impose annually great losses. Threatens and hazards resulted from ample and repetitive application of chemical pesticides against plant diseases tended to pay attention to natural, safe and environment-friendly products. Lichens due to possessing of great antimicrobial substances has been considered as one of the best sources for natural alternative products. In this research study, growth inhibition, bacteriostatic and bactericidal potential of methanol extract of five lichens including *Pleopsidium gobiensis*, *Parmelina tiliacea*, *Anaptychia setifera* and *Lecanora argopholis* obtained from Arasbaran, East Azarbaijan province of Iran on some plant pathogenic bacteria such as *Pectobacterium atrosepticum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Rhizobium tumefaciens* were studied using disc diffusion, minimal inhibitory and bactericide concentration methods. All lichen methanol extracts were bacteriostatic and bactericide on the above-mentioned bacteria. However, *R. tumefaciens* was the lowest senility to these extracts. Methanol extract of *P. gobiensis* was as inhibitive as streptomycin on *P. syringae* pv. *syringae* growth. In additionm, *P. atrosepticum* and *X. arboricola* pv. *juglandis* were highly sensitive to lichen extracts and streptomycin. The most bactericidal extracts was related to *P. gobiensis* on *P. atrocepticum* and *P. tiliacea* on *X. arboricola* pv. *juglandis*. Considering the results, it is suggested that lichen extracts may have remarkable potential in plant pathogenic bacteria and more investigations are required in the future studies.

Keywords: biocontrol, antibacterial activity, natural compounds, MIC and MBC.