فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی
جلد ۱۱، شماره ۴، صفحات ۹۵ – ۸۷
(زمستان ۹۴)

خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های پنج گونه گلسنگ روی *Fusarium oxysporum* و *Ralstonia solanacearum* عوامل پوسیدگی سیب‌زمینی

فرید هوشیار
مدرس مرکز گرمی
دانشگاه پیام نور
گرمی، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
houshyar.farid@gmail.com

سلیمان جمشیدی*
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
واحد میانه
دانشگاه آزاد اسلامی
میانه، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
s.jamshidi@m-iau.ac.ir
* مسول مکاتبات

محمد سهرابی
استادیار پژوهشکده زیست فناوری
سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی
ایران
تهران، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
mycolichiran2010@gmail.com

چکیده استفاده از خاصیت ضدمیکروبی گلسنگ‌ها می‌تواند از جمله روش‌های همگام با طبیعت و کم‌خطر در مدیریت بیماری‌های گیاهی باشد. در این پژوهش، فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های استونی، متانولی و کلروفرمی پنج گونه گلسنگ بومی شامل *Ramalina capitaat*، *Xanthoparmelia stenophylla*، *Umbilicaria cylindrica* و *Rhizoplaca crysoleuca* شناسایی شد. گونه *Anamylopsora pulcherrima* جمع‌آوری شده از ارتفاعات مشگین‌شهر و داران جلفا علیه قارچ *Fusarium oxysporum* و باکتری *Ralstonia solanacearum* عوامل پوسیدگی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه به روش دیسک‌گذاری و حداقل غلظت بازدارنده و کشنده و نیز شرایط شبیه‌سازی شده انبار مورد بررسی قرار گرفت. دیسک حاوی حلال خنثی دی‌متیل‌سولفوکساید به عنوان شاهد منفی و دیسک حاوی بنومیل ۰/۲٪ و دیسک آنتی‌بیوگرام جنتامایسین به عنوان شاهدان مثبت به ترتیب برای قارچ و باکتری در نظر گرفته شد. عصاره گلسنگ‌های مورد بررسی روی قارچ مذکور تأثیری نداشتند، در حالی که عصاره کلروفورمی گلسنگ *R. capitata* فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی روی باکتری مذکور نشان دادند. عصاره گلسنگ‌های *R. chrysoleuca* و *R. capitata* بازدارنده‌تر و کشنده‌تر از بقیه علیه باکتری بودند. بررسی انباری با آغشته کردن غده‌های سیب‌زمینی با عصاره‌های منتخب گلسنگی بعد از مایه‌زنی با باکتری بیماریزا نشان داد که بیش از ۸۰٪ عصاره‌ها خاصیت پیشگیری کننده داشتند. عصاره‌های گلسنگی مورد بررسی می‌تواند به عنوان یک فرآورده بیولوژیکی جایگزین فرآورده‌های شیمیایی مدنظر قرار گیرد.

شناسه مقاله:
نوع مقاله: **پژوهشی**
تاریخ پژوهش: **۱۳۹۲**
تاریخ دریافت: **۹۴/۱۰/۰۹**
تاریخ پذیرش: **۹۵/۰۲/۲۰**

واژه‌های کلیدی:
- آنتی‌میکروبیال
- حداقل غلظت بازدارنده
- حداقل غلظت کشنده
- کنترل طبیعی
- مهار زیستی

مقدمه بیماری‌های پس از برداشت، ۱۰ الی ۳۰٪ محصولات را به ویژه در کشورهای در حال توسعه از بین می‌برند.[۲] پوسیدگی غده و قطعات بذری سیب‌زمینی مهم‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های پس از برداشت و انبارداری محسوب می‌شوند.[۱۷] قارچ فوزاریوم عامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی با پراکندگی بالا در سراسر دنیا و اقلیم‌های مختلف علاوه بر خسارت کمی، به علت تولید زهرابه، خطر جدی برای سلامت انسان و دام به شمار می‌روند.[۱۴،۱۷]

غده‌های سیب‌زمینی پس از کاشت و یا قبل از برداشت و یا در زمان انبارداری ممکن است به بیماری پوسیدگی باکتریایی نرم غده دچار شوند. بافت‌های پوسیده غده نرم، مرطوب و برنزه تا کرم رنگ می‌باشد و به راحتی از طریق شستشو از بافت سالم جدا می‌شوند و عموماً حاشیه لکه‌ها به رنگ قهوه‌ای تا سیاه دیده می‌شوند در ابتدا بافت‌های پوسیده غده فاقد بو می‌باشد ولی با گذشت زمان از بافت پوسیده بوی بد به مشام می‌رسد و بافت حالت لزج و چسبنده پیدا می‌کند.[۹] پژمردگی سیب‌زمینی در اثر حمله باکتری *Ralstonia solanacearum* علاوه بر مرگ بوته‌های سیب‌زمینی در مزرعه، سبب پوسیدگی غده‌ها در انبار و سردخانه نیز می‌شود. اگر چه پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی توسط باکتری *R. solanacearum* در انبار و در حین حمل و نقل قبلاً در برخی از نقاط دنیا گزارش شده بود.[۱۲] اما در ایران اولین گزارش از پوسیدگی انباری سیب‌زمینی ناشی از باکتری در سال ۱۳۸۵ منتشر شده است.[۵]

استفاده از ترکیبات شیمیایی باعث آلودگی‌های زیست محیطی، تهدید سلامتی بشر و با توجه به مقاومت روزافزون میکروارگانیسم‌ها در مقابل مبارزه شیمیایی و گرایش عمومی به ترکیبات طبیعی از جمله اثرات ضدمیکروبی گلسنگ‌ها اهمیت خاصی یافته است. گلسنگ‌ها از مهمترین منابع منحصربه‌فرد شناخته‌شده‌ای هستند که دارای تولیدات طبیعی با خواص دارویی و ضدمیکروبی از گروه‌های بیوشیمیایی مختلف مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدها، ترکیبات فنلی و رنگدانه‌ها می‌باشند[۱،۳،۸] و به ویژه بخش قارچی آنها قادرند انواع مختلفی از ترکیبات آلی و بیوشیمیایی را تولید نمایند.[۱۵،۲۰] ترکیبات متعدد آلی در گونه‌های مختلف گلسنگ‌ها وجود دارد که برای قارچ‌ها و باکتری‌ها سمی بوده و سبب بازدارندگی رشد آنها می‌گردد.[۱۶] مطالعه روی مواد آنتی‌بیوتیک استخراج شده از گلسنگ‌ها توسط بورخولدر و همکاران *(۱۹۴۴)* آغاز شد.[۷] از آن زمان تا به امروز آنتی‌بیوتیک‌های بی‌نظیری از گلسنگ‌ها کشف شده که روی دامنه وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله باکتری‌های گرم‌مثبت و برخی از قارچ‌ها مؤثر بوده است.[۳،۷] خاصیت ضدقارچی هشت گونه گلسنگ در مقابل قارچ *Colletotrichum acutatum* عامل آنتراکنوز در فلفل مورد بررسی قرار گرفت که همگی بیش از ۵۰٪ خاصیت مهار و بازدارندگی رشد میسلیومی عامل بیماریزا از خود نشان دادند. از این میان گونه *Lecanora argentata* تأثیر بالاتری در جلوگیری از رشد میسلیومی داشت. آنها نشان دادند قارچ گلسنگ‌ساز می‌تواند به عنوان یک منبع زیستی امیدوارکننده‌ای برای توسعه زیست قارچ‌کش‌ها باشد.[۲۱] اثرات بازدارندگی عصاره گلسنگ‌های مختلف روی قارچ‌های فساد کننده چوب ثابت شده است.[۱۱] *آکپینار و همکاران (۲۰۰۹)* در مطالعات خود تأثیر سه گونه گلسنگ *Cladonia rangiformis*، *Peltigera neckerii* و *Peltigera rufescens* را بر باکتری‌های خاکزی

Burkholderia gladioli، *Corynebacterium bovis*، *Aerococcus* sp. و *Bacillus* sp. مطالعه و به این نتیجه رسیدند که گلسنگ *P. rufescens* هیچگونه تأثیر بازدارنده روی باکتری‌های خاکزی ندارد ولی دو گونه گلسنگ دیگر بر باکتری‌ها بازدارنده‌اند[۴]. *ساتی و جوشی (۲۰۱۱)* با بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی، اتانولی، کلروفورمی و آبی گلسنگ *Parmotrema aligherrense* در مقابل باکتری‌های بیماریزای گیاهی و انسانی گزارش کردند که تمام عصاره‌های گلسنگ مذکور در مقابل باکتری‌های مورد مطالعه دارای خاصیت ضدباکتری می‌باشد، عصاره کلروفورمی با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۳۸ میلی‌متر، نسبت به عصاره‌های اتانولی و متانولی خاصیت ضدباکتریایی قوی‌تری داشت و عصاره آبی هیچ‌گونه تأثیری در رشد باکتری‌ها نداشت.[۱۹]

تحقیق حاضر با هدف تعیین کارآیی گلسنگ‌های بومی برای مهار یک باکتری و قارچ بیماریزا در سیب‌زمینی و امکان مهار زیستی آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها چهار گونه گلسنگ شامل *Ramalina capitaat*، *Xanthoparmelia stenophylla*، *Umbilicaria cylindrica* و *Rhizoplaca crysoleuca* از روستاهای وله‌زیر و موئیل و محدوده پروژه زمین گرمایی مشگین-شهر و گونه *Anamylopsora pulcherrima* از منطقه داران از توابع جلفا همگی از بستر سنگی در اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ جمع‌آوری و توسط کلید شناسایی گلسنگ‌های ایران (سامانه مایکولیک ایران) شد (جدول ۱). گلسنگ‌ها در آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه شستشو و پس از خشک کردن با مخلوط‌کن خرد و پودر گردید. عصاره‌گیری با سوکسله انجام شد. برای هر مرحله از عصاره‌گیری از هر گلسنگ مقدار ۲۰ گرم گلسنگ خرد شده در ۲۵۰ میلی‌لیتر حلال شامل استون، متانول و کلروفرم به صورت جداگانه استفاده شد. پس از انجام عصاره‌گیری توسط دستگاه سوکسله، حلال از عصاره با دستگاه روتاری[1] جداسازی شد. بعد از عمل تغلیظ عصاره، ۵۰ میلی‌گرم از عصاره خشک و غلیظ شده گلسنگ در ۲ میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکساید[2] حل و با استفاده از سرنگ فیلتر ۰/۲ میکرون سترون شد.

در این تحقیق از قارچ *Fusarium oxysporum* عامل پوسیدگی خشک و باکتری عامل پوسیدگی نرم در سیب‌زمینی *R. solanacearum* تهیه شده از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور استفاده شد. دیسک‌های سترون[3] با قطر ۶ میلی‌متر به صورت آماده ساخت شرکت پادتن طب سترون روی سطح محیط کشت موردنظر قرار داده شده و توسط سمپلر ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های عصاره مختلف روی دیسک‌ها ریخته شد. قطر هاله بازدارندگی رشد اطراف دیسک در مورد قارچ پس از ۶ روز در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و در مورد باکتری پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس اندازه-گیری شد.[۵] برای قارچ از قارچ‌کش بنومیل ۵۰٪ پودر وتابل ساخت شرکت بهاورشیمی با دز ۰/۲٪ به عنوان شاهد مثبت و برای باکتری از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به صورت

[1] rotary evaporator

[2] dimethyl sulfoxide (DMSO)
[3] blank disc

جدول ۱) مشخصات جغرافیایی محل جمع آوری گلسنگ‌های مورد مطالعه

Table 1) Lichens collection sites geographical features

Lichen scientific name	collection site	longitude (E)	latitude (N)	altitude (m)
Anamylopsora pulcherrima	Daran, Jolfa	45° 12' 42"	38° 25' 76"	1300
Ramalina capitaat	Valazir, Meshginshahr	38° 19' 03"	47° 40' 26"	1800
Xanthoparmelia stenophylla	Meshginshahr	38° 20' 28"	47° 40' 28"	1790
Umbilicaria cylindrica	Moeel Meshginshahr	38° 15' 55"	47° 44' 21"	2805

آماده ساخت شرکت پادتن طب به عنوان شاهد مثبت و از حلال دی‌متیل-سولفوکساید هم به عنوان شاهد منفی برای هر دو تیمار استفاده شد. سوسپانسیون کنیدی با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه ش و برای انجام آزمون از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز[1] آگار استفاده گردید. و در تهیه سوسپانسیون باکتری با غلظت استاندارد نیم مک‌فارلند[2] کدروت‌سنجی شد. برای انجام آزمون ضدباکتریایی از محیط کشت مولرهینتون آگار[3] استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسم موردنظر در روی محیط منعقد شده ریخته و به وسیله سوزن فلزی سترون، به طور کامل روی محیط کشت پخش شد و در نهایت، پس از ۲۰ دقیقه دیسک‌های شاهدان و آغشته به عصاره‌ها به صورت جداگانه با پنس سترون روی محیط‌های کشت در فاصله معین و در سه تکرار قرار داده شد. بعد از موعد مقرر، میانگین سه بار تکرار قطر هاله بازدارندگی رشد در اطراف دیسک‌ها برحسب میلی‌متر محاسبه شد.

برای عصاره گلسنگ‌هایی که در آزمایش قبلی اثر ضدباکتریایی علیه باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند، حداقل غلظت بازدارندگی و کشنده تعیین شد. از حلال بدون عصاره به عنوان شاهد منفی برای ارزیابی تأثیر عصاره‌ها استفاده شد، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد به وسیله روش لوله‌های رقت‌سازی بررسی گردید. در این آزمون از محیط کشت مولر هینتون براث[4] استفاده شد. غلظت‌های عصاره-های مختلف گلسنگ‌ها روی باکتری‌های مورد مطالعه بین ۰/۳۹ الی ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در این بخش از نُه لوله آزمایش سترون استفاده گردید که به ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت هینتون براث تهیه شده در هر کدام از لوله‌های آزمایش ریخته شد، یکی از لوله‌های آزمایش به عنوان شاهد مثبت حاوی محیط کشت و باکتری و لوله آزمایش دیگر به عنوان شاهد منفی حاوی فقط محیط کشت انتخاب شد. هفت لوله آزمایش باقی‌مانده از ۱ تا ۷ شماره-گذاری گردید و غلظت‌های ۲۵، ۲۰ میکرولیتر ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸ و ۰/۳۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. سپس از سوسپانسیون باکتری برداشته و داخل تمام لوله‌ها به جز شاهد منفی ریخته شد. بعد از انجام کشت در لوله و انکوباسیون مناسب به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس از نظر رشد یا عدم رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا[5] با اندازه متوسط بین ۹۸-۸۰ گرم از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اردبیل تهیه گردید. برای انتخاب تیمارها جهت به کار بردن در شرایط انباری میانگین هاله‌های عدم رشد به دست آمده با استفاده از

[1] Potato Dextrose Agar (PDA)
[2] McFarland
[3] Muller Hinton Agar
[4] Muller Hinton Broth
[5] Agria

آزمون دانکن مقایسه شدند و چهار ترکیب تیماری از عصاره‌های گلسنگی و باکتری که بالاترین تأثیر را روی باکتری از نظر بازدارندگی از رشد داشتند، انتخاب شده شامل عصاره متانولی *R. chrysoleuca*، عصاره استونی *R. capitata* و *R. chrysoleuca* و نیز عصاره کلروفورمی *R. capitata* در این آزمایش گنجانده شد. از عصاره‌های خشک گلسنگ‌های *R. chrysoleuca* و *R. capitata* غلظت ۱۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکساید تهیه شد. غده‌های سیب‌زمینی با آب معمولی شستشوی سطحی و سپس خشک شد. غده‌های سیب‌زمینی توزین و وزن اولیه آنها یادداشت شد. روی سیب‌زمینی که خراش‌هایی سطحی به عمق ۵ میلی‌متر و طول ۴ سانتی‌متر ایجاد و با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌های گلسنگ آغشته شدند. سوسپانسیون باکتری در افشانه شیشه‌ای سترون ریخته شده و روی غده سیب‌زمینی پاشیده شد. غده‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۵٪ به مدت ۷ روز نگهداری شدند و پس از تخلیه بخش‌های پوسیده، با آب شستشو داده شده و وزن گردیدند. درصد باقیمانده سیب‌زمینی در هر تیمار با استفاده از روابط زیر محاسبه شد:

$$\frac{\text{وزن ثانویه سیب‌زمینی} * 100}{\text{وزن اولیه سیب‌زمینی}}$$

آزمایش‌های تکراردار در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و برای تجزیه آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS ver. 16 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن با اطمینان ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث خاصیت ضدقارچی روی *F. oxysporum* نداشت. ایجاد هاله بازدارنده با میانگین قطر ۱۶ میلی‌متر در شاهد مثبت بنومیل ۲ در هزار نشان از صحت انجام آزمایش بود. بین تیمارها از لحاظ ممانعت از رشد باکتری *R. solanacearum* در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($MS=262.001^{**}$).

جدول ۲) قطر هاله بازدارنده ایجاد شده در پرگنه *Ralstonia solanacearum* و حداقل غلظت بازدارنده و کشنده در اثر عصاره‌های مختلف گلسنگ‌های مورد مطالعه

Table 2) Inhibition zone, minimal inhibitory and bactericidal concentrations of lichens extracts caused in *Ralstonia solanacearum* colony affected by studied lichens extracets

Lichen	solvent	inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC/MBC
Anamylopsora pulcherrima	Acetone	13.33 g	1.56	6.25	4
	Methanol	8.50 j	3.12	12.50	4
	Chloroform	6.00 l	0.00	0.00	0
Ramalina capitata	Acetone	23.33 c	1.56	3.12	2
	Methanol	19.00 e	0.00	0.00	0
	Chloroform	23.17 c	1.56	3.12	2
Xanthoparmelia stenophylla	Acetone	6.00 l	0.00	0.00	0
	Methanol	6.00 l	0.00	0.00	0
	Chloroform	17.50 f	1.56	6.25	4
Umbilicaria cylindrical	Acetone	10.00 h	3.12	12.5	4
	Methanol	9.17 hi	3.12	6.25	2
	Chloroform	13.67 g	3.12	6.25	2
Rhizoplaca chrysoleuca	Acetone	23.17 c	0.78	3.12	4
	Methanol	25.00 b	0.78	1.56	2
	Chloroform	22.17 d	1.56	3.12	2
Gentamicin	-	28.00 a	-	-	-
Control	-	6.00 k	-	-	-

جدول ۳) درصد باقیمانده غده سیب‌زمینی آلوده به باکتری *Ralstonia solanacearum* بر اثر اعمال تیمار عصاره‌های گلسنگی در شرایط انباری

Table 3) residue percentage of potato tubers infected to *Ralstonia solanacearum* affected by lichen extracts treatments in storage condition

Lichen	solvent	weight before infection (g)	weight after infection (g)	residue percentage (%)
Rhizoplaca chrysoleuca	methanol	87.92	80.63	91.70 a
Ramalina capitata	acetone	85.87	78.61	91.54 a
Rhizoplaca chrysoleuca	acetone	94.49	86.16	91.19 a
Ramalina capitata	chloroform	86.85	80.23	92.38 a
Control	-	94.63	27.87	29.45 b

بین گلسنگ‌ها عصاره متانولی گلسنگ *R. chrysoleuca* بیشترین هاله بازدارنده را به قطر ۲۵ میلی‌متر ایجاد کرد و عصاره‌های کلروفورمی گلسنگ *A. pulcherrima*، استونی و متانولی *X. stenophylla* و همانند شاهد منفی در باکتری *R. solanacearum* هاله‌ای ایجاد نکرد. شاهد منفی که شامل دیسک آغشته به حلال دی‌متیل‌سولفوکساید بود، هیچ گونه هاله‌ای بازدارنده‌ای اطراف خود ایجاد نکرد. شاهد مثبت جنتامایسین، با ایجاد هاله‌ای با میانگین قطر ۲۸ میلی‌متر، از لحاظ عددی مؤثرترین تیمار مورد استفاده بود. عصاره گلسنگ *R. chrysoleuca* استخراج شده با هر سه حلال از لحاظ آماری نسبت به سایر گلسنگ‌ها اثر بیشتری بر ممانعت از رشد باکتری داشت و با این حال تیمار عصاره متانولی گلسنگ *R. chrysoleuca* مؤثرترین تیمار در بازدارندگی بود و بعد از آن، عصاره‌های استونی و کلروفورمی گلسنگ‌های *R. capitata* و *R. chrysoleuca* از لحاظ آماری توانستند اثر مشابهی بر ممانعت از رشد این باکتری بگذارند. ظاهراً حلال کلروفورم از هر پنج بخش مورد استفاده برای عصاره گیری توانسته مقدار زیادی از مواد بازدارنده در گلسنگ‌ها را آزاد نماید. در گلسنگ‌های *U. cylindrica* و *X. stenophylla* کلروفورم موفق‌تر از حلال‌های استون و متانول عمل نموده است. همچنین به نظر می‌رسد در عصاره‌گیری از *A. pulcherrim* فقط استون می‌تواند عصاره‌ای با قابلیت ممانعت کنندگی قابل توجه برابر باکتری *R. solanacearum* تولید نماید. سایر عصاره‌های تولید شده با یکدیگر و شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهند. به طور کلی عصاره کلروفورمی گلسنگ *A. pulcherrim* و عصاره استونی و متانولی گلسنگ *X. stenophylla* برابر باکتری*R. solanacearum* هاله بازدارنده‌ای در اطراف دیسک ایجاد نکرد و در یک سطح از لحاظ آماری با شاهد منفی قرار داشت (جدول ۲).

حداقل غلظت بازدارنده در عصاره‌های استونی و متانولی *Rhizoplaca chrysoleuca*، برابر با ۰/۷۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر شد و حداقل غلظت کشنده عصاره متانولی ۱/۵۶ و عصاره استونی، ۳/۱۲ میلی-گرم در میلی‌لیتر برآورد شد. در حالی که حداقل غلظت بازدارنده عصاره کلروفورمی برابر با ۱/۵۶ و حداقل غلظت کشنده برابر با ۳/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر شد. عصاره متانولی *R. chrysoleuca* کمترین غلظت بازدارنده و کشنده بترتیب برابر با ۰/۷۸ و ۱/۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برآورد شد که بیانگر این است که عصاره متانولی این گلسنگ غلظت بیشتری داشت. می‌توان گفت

عصاره گلسنگ‌های مورد مطالعه در غلظت‌های دو برابر غلظت بازدارنده، کشنده بود و بیانگر این است که برای کشتن باکتری، بایستی از غلظت‌های دو برابر غلظت بازدارنده استفاده کرد. که حداقل غلظت بازدارنده و کشنده بیشتر عصاره‌ها در این غلظت قرار داشتند. این موضوع نشان می‌دهد که این غلظت برای کشتن باکتری، غلظت مناسبی است و که با نتایج مربوط به دیسک‌گذاری همخوانی دارد. بدین معنی که هر قدر قطر هاله عدم رشد در آزمایش دیسک‌گذاری بیشتر باشد، حداقل غلظت بازدارنده و کشنده مربوطه کمتر می‌شوند. در بررسی انباری مشخص شد که با اعمال تیمار عصاره‌های گلسنگی روی غده سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با باکتری *R. solanacearum* و شاهد مثبت از نظر درصد باقیمانده سیب‌زمینی، بین ترکیبات تیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت (MS = 2325.416**). در سیب‌زمینی شاهد بدون کاربرد عصاره گسنگی از غده فقط ۲۹/۴۵٪ باقیمانده بود. در واقع بخش عمده‌ای از سیب‌زمینی یعنی ۷۰/۵۵٪ آن در اثر مایه‌زنی با باکتری از بین رفته و اختلاف آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود. به این معنی که کلیه تیمارهای گلسنگی توانسته‌اند نسبت به شاهد درصد قابل توجهی از سیب‌زمینی را از آسیب باکتری محافظت نمایند (جدول ۳). عصاره متانولی گلسنگ *Rş chrysoleuca* روی باکتری *R. solanacearum* با ایجاد هاله عدم رشد ۲۵ میلی‌متری و در مجموع بازدارندگی بیشتر عصاره‌های حاوی حلال آزمایش‌های *ساتی و جوشی (۲۰۱۱)* را تقویت می‌کند.[۱۹]

نتیجه‌گیری کلی

بیش از ۸۰٪ عصاره‌های گلسنگ مورد مطالعه اثر ضدباکتری داشتند و توانستند در آزمایشگاه از رشد باکتری و در انبار از توسعه پوسیدگی نرم ناشی از آنها جلوگیری کنند. هیچ‌کدام از عصاره‌ها در آزمایشگاه خاصیت ضدقارچی از خود نشان ندادند. در بین گلسنگ‌ها، گلسنگ‌های *R. capitata* و *R. chrysoleuca* بیشترین هاله بازدارنده را بر رشد باکتری مورد مطالعه داشتند. عصاره متانولی گلسنگ *R. chrysoleuca* روی باکتری *R. solanacearum* با ایجاد هاله عدم رشد ۲۵ میلی‌متری بیشترین هاله بازدارنده را ازخود نشان دادند. در مجموع حلال کلروفورم توانایی استخراج مواد ضدباکتریایی بیشتری داشت و حلال استون و متانول به ترتیب در رتبه‌های بعدی بودند. در بررسی انباری بین عصاره‌های منتخب گلسنگی بیشترین مقدار محافظت سیب‌زمینی مربوط به عصاره کلروفورمی گلسنگ *R. capitata* بود.

Reference

1. Afzal AM, Rahber-Bhatti MH, Aslam M (1997) Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris* pv. citri. International Journal of Pest Management 43 (2): 149-153.
2. Agrios GN (2005) Plant Pathology, 5th edition. Academic Press: New York. 1026 pp.
3. Ahmadjian V and Hale ME (1973). Methods of isolating and culturing lichen symbiontsandthalli. In The Lichens, Academic Press: London 653–659.
4. Akpinar AU, Ozturk S, Sinirtas M (2009) Effects of some terricolous lichens *Cladonia rangiformis*, *Peltigera neckerii* and *Peltigera rufescens* on soil bacteria in natural conditions. Plant Soil Environ, 55(4): 154–158.

5. Azadvareh M, Ershad J (2007) A survey on potato rot agents in storage and springhouses if Jiroft region. Paxhuhesh and Sazandegi, Agronomy and Horticulture Journal 97: 97-101.
6. Boonywanich S, Panutat P (1998) Studies on antibacterial potential of extracts from *Hydnocarpus anthelmintica* against plant pathogenic bacteria. Science and Technology Publishing House: Bangkok.
7. Burkholder P, Evansa W, Mcveigh I, Thorntonh K (1944) Antibiotic activity of lichens. Proceedings of the National Academy of Sciences 30: 250–255.
8. Elix JA, Stocker-Wörgötter E (2008) Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash TH, III: Lichen Biology. 2nd Edition. Cambridge University Press: Cambridge 104-133.
9. Habibi J, Hajianfar R, Mirkamali H (2003) Potato important pest, diseases and weeds in Iran and their integrated management. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Nashre Amouzeshe Keshavarzi: Tehran. 152 pp.
10. Halama P, van Haluwin C (2004) Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. BioControl 49: 95–107.
11. Henningsson B, Lundstrom H (1970) The influence of lichens, lichen extracts and usnic acid on wood destroying fungi. Material and Organism 5: 19–31.
12. Hooker TN (1980) lobe growth and marginal zonation in crustose lichens, Lichenologist 12(3): 313-323.
13. Huneck S (1999) The Significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften 86: 559-576.
14. Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA (1984) Toxigenic Fusarium species identity and mycotoxicology. Pennsylvania State University Press: Pennsylvania 328 pp.
15. Nash TH (1996) Lichen biology. Cambridge University Press: Cambridge 303 pp.
16. Romagni JG, Rosell RC, Nanayakkara NPD, Dayan FE (2004) Ecophysiology and potential modes of action for selected lichen secondary metabolites. In: Macías FA, Galindo JCG, Molinillo JMG, Cutler HG (eds.): Allelopathy, chemistry and mode of action of allelochemicals. CRC Press: Florida 13-33.
17. Rowe RC (1993) Potato Health Management. APS Press: Saint Paul 178 pp.
18. Ranković B, Mišić M, Sukdolak S (2007) Antimicrobial activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. British Journal of Biomedical Science 64(4): 143-148.
19. Sati SC, Joshi S (2011) Antibacterial activity of the Himalayan lichen *Parmotrema nilgherrense* Extracts. British Microbiology Research Journal 1(2): 26-32.
20. Tomas HN (2008) Lichen biology. Arizona State University: Arizona 498 pp.
21. Xinli W, Hae-Sook J, Keon Seon H, Young Jin K, Jae-Seoun H (2008) Antifungal activity of lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. Plant Pathology Journal 24(2): 202-206.
22. Yılmaz M, Tay T, Kıvanc M, Türk H, Ozdemir Türk A (2005) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulosa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. Z Naturforsch 60c, 35-38.

Antimicrobial *in vitro* and *in vivo* potential of five lichen species on *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum*, agents of potato rots

Agroecology Journal
Volume 12, Issue 1, pages 87-95
winter, 2016

Farid Houshyar
Lecturer of Germi Branch
Payame nour University
Germi, Iran
E-mail ✉:
houshyar.farid@gmail.com

Soleiman Jamshidi*
Young Researchers and Elite Club
Miyaneh Branch
Islamic Azad University
Miyaneh, Iran
E-mail ✉:
s.jamshidi@m-iau.ac.ir
(corresponding author)

Mohammad Sohrabi
Assistant professor of Biotechnology Research Center,
Iranian Research Organization for Science and Technology
Tehran, Iran
E-mail ✉:
mycolich@yahoo.com

Received: 30 December 2015 **Accepted:** 09 May 2016

ABSTRACT Using of lichens antimicrobial potential can be one of the safe, green, environment friendly methods for plant diseases management. In this study, antimicrobial activity of acetone, methanol, chloroform extracts of *Ramalina capitaat*, *Xanthoparmelia stenophylla*, *Umbilicaria cylindrical*, *Rhizoplaca crysoleuca* and *Anamylopsora pulcherrima* collected from Meshgin shahr and Jolfa mountains were evaluated against two potato rot agents vic. *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum* in laboratory using disc diffusion and minimum inhibitory and bactericide concentration methods and simulated storage conditions. Dimethyl sulfoxide solvent on paper disc was used as negative control. Positive controls were considered as %0.2 benomyl and gentamicin antibiogram discs for fungus and bacterium, respectively. There were no effect of lichens extract on above-mentioned fungus. Chlorophorm extract of *R. capitata* had remarkable antibacterial activity on *R. solanacearum*. Extracts of *R. crysoleuca* and *R. capitata* were more bacteriostatic and bactericide than others against the bacterium. The study with selected extracts in storage condition showed preventive effect of 80% of extracts on bacterium. The most protective effect was observed in methanol extract of *R. chrysoleuca*. Therefore, the lichen extracts would be promising biological product as a potential replacement instead of chemicals.

Keywords:
- antibacterial
- MIC
- MBC
- biocontrol
- natural control