

تأثیر عصاره‌های گیاهی بر کاهش رشد باکتری عامل شانکر باکتریایی بادام

Pseudomonas syringae pv. *syringae*) در شرایط آزمایشگاهThe effect of plant extracts on reducing the growth of almond bacterial canker agent (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) in vitro conditionsمحمدرضا ارژنگ^۱، جلال غلام‌نژاد^{۲*}، اعظم جعفری^۲، حیدر مفتاحی‌زاده^۲ و مهسا برهمت^۳

دریافت: ۱۴۰۳/۴/۱۱

پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۱۹

چکیده

بادام بومی آسیای میانه و ایران است و جزء مهمترین محصولات باغی کشور بوده و جایگاه مهمی در بین محصولات باغی کشور به‌ویژه سمت غرب کشور دارد. بیماری شانکر باکتریایی با عامل *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به بیماری بلاست جوانه و بلاست شکوفه هم معروف است. با توجه به اهمیت این بیماری و لزوم انجام مبارزه صحیح و اصولی با آن، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی شامل اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ بر کاهش بیماری‌زایی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* و معرفی غلظت مؤثر و کاربردی از عصاره‌های گیاهی در آزمون آزمایشگاهی انجام شد. آزمون بر روی محیط کشت Nutrient Agar انجام شد و برای شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. برای هر عصاره سه تکرار در نظر گرفته شد. غلظت‌های عصاره‌های آبی و الکلی شامل ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm بود. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از ریختن عصاره‌ها در چاهک‌ها، هاله بازدارنده رشد اطراف چاهک اندازه‌گیری شد و در نهایت درصد کنترل‌کنندگی هر عصاره در مقایسه با شاهد آب مقطر محاسبه گردید. نتایج نشان داد بهترین اثر بازدارندگی در بین عصاره‌های آبی مربوط به عصاره آبی اسطوخودوس با غلظت ۲۰۰۰ ppm به میزان ۸۲/۴۵ درصد و کمترین بازدارندگی مربوط به عصاره آبی بن‌سرخ با غلظت ۵۰۰ ppm به میزان ۲۹/۶۸ درصد بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* در شرایط آزمایشگاه بود؛ بهترین اثر بازدارندگی در بین عصاره‌های الکلی مربوط به عصاره الکلی اسطوخودوس با غلظت ۲۰۰۰ ppm به میزان ۸۴/۱۲ درصد بود و عصاره الکلی بن‌سرخ با غلظت ۵۰۰ ppm کم‌ترین اثر بازدارندگی به میزان ۳۴/۱۲ درصد را بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* در شرایط آزمایشگاه داشت؛ تمامی تیمارهای مورد استفاده در این پژوهش در سطح آماری بهتری نسبت به تیمار شاهد قرار گرفتند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که عصاره‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش خاصیت بازدارندگی علیه باکتری عامل بیماری شانکر باکتریایی در شرایط آزمایشگاه داشتند؛ لذا با یافتن فرمولاسیون‌هایی از ترکیبات گیاهی مانند عصاره‌ها می‌توان به‌عنوان ترکیبات جایگزین با خاصیت گیاه‌سوزی کمتر، خطرات زیست‌محیطی کمتر و تضمین‌کننده سلامت انسان و محیط‌زیست، علیه این باکتری استفاده نمود.

واژگان کلیدی: شانکر باکتریایی، بادام، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، عصاره گیاهی

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis*) از تیره رزاسه (*Rosaceae*) بومی آسیای میانه و ایران است (Čolić et al., 2019). بیشترین سطح زیر کشت آبی و میزان تولید بادام در ایران به ترتیب متعلق به استان‌های چهارمحال و بختیاری، فارس، خراسان رضوی، آذربایجان شرقی، کرمان، اصفهان و مرکزی است؛ در این میان استان چهارمحال و بختیاری به‌عنوان یکی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

۲- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

از قطب‌های تولید بادام دارای اهمیت خاصی بوده و بادام در اقتصاد باغداران این استان دارای جایگاه ویژه‌ای است (سرملی و همکاران، ۱۴۰۲).

یکی از عوامل اصلی مدنظر تولیدکنندگان بادام، مقاومت به آفات و بیماری‌های کلیدی در باغات است. درخت بادام همانند سایر هسته‌داران از بیماری‌های متعدد قارچی، باکتریایی و ویروسی صدمه می‌بیند، که از آن میان می‌توان به بیماری شانکر باکتریایی با عامل *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* اشاره کرد. این بیماری از اغلب مناطق میوه‌کاری دنیا گزارش شده است، به‌خصوص در مناطق دارای شرایط آب‌وهوایی معتدل و مرطوب بسیار جدی است (Ivanović et al., 2013). باکتری *P. syringae* pv. *syringae* میله‌ای شکل با تاژک قطبی، گرم منفی و هوازی است (Shila et al., 2013) و در حضور اسیدآمینه آرژنین می‌تواند به‌صورت بی‌هوازی رشد کند (Tribelli et al., 2019). اکثر سویه‌ها روی محیط کشت فقیر از نظر آهن، تولید رنگدانه فلورسنت تحت نور ماوراءبنفش (طول موج ۲۵۴ نانومتر) می‌کنند (Dulla et al., 2010). در اغلب موارد پراکنده‌های این باکتری روی محیط کشت NA کرم رنگ است (باساوند و همکاران، ۱۳۹۰). بسیاری از جدایه‌های این باکتری در دمای منفی پنج تا پنج درجه سلسیوس، هسته یخ تولید می‌کنند (De Araujo et al., 2019).

مبارزه شیمیایی به کمک محلول بردو در بهار قبل از شکوفه‌دهی و یا استفاده از اکسی کلروورمس و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و اریترومایسین برای کنترل بیماری توصیه شده است، که علاوه بر مقرون به صرفه نبودن، موجب بروز مقاومت در جمعیت‌های باکتریایی شده و در بسیاری از کشورهای پیشرفته مجوز مصرف ندارند؛ به‌طور کلی در طولانی مدت هیچ‌یک از این راه‌حل‌ها نتوانسته‌اند نتیجه مطلوبی در پی داشته و در عین حال، به نگرانی‌های بشر در رابطه با مصرف سموم هم افزوده‌اند. مصرف سموم علاوه بر اتلاف سرمایه، تحمیل هزینه مضاعف به کشاورزان و در نهایت اضافه شدن قیمت محصول برای مصرف‌کننده، مشکلات جانبی و زیست‌محیطی به مراتب خطرناک‌تری را به دنبال دارد، که امروزه این مشکلات بر همگان محرز است (Cacique et al., 2019). لذا استفاده از ترکیبات گیاهی (عصاره‌های گیاهی) به‌عنوان جایگزین ترکیبات شیمیایی که هم اثربخشی بهتر و هم برای محیط‌زیست و انسان بی‌خطر است، استفاده کرد (Tariq et al., 2019).

اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*)، گیاهی چند ساله و همیشه سبز از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است (Abu-Lafi et al., 2008). ارتفاع گیاه بین ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر، گل‌ها به‌صورت خوشه‌ای انتهایی و مجتمع در رأس ساقه است (Bakkali et al., 2008). عصاره اسطوخودوس شامل ۴۰ ترکیب مختلف شامل لینالیل استات، سینئول‌ها، لینالول‌ها، آنتوسیانین‌ها، مونوترپن‌ها، ترکیبات فنلی، تانن‌ها و فلاونوئیدها است (Prusinowska and Śmigielski, 2014). کارده (*Biarum carduchorum*) از گیاهان تیره گل شیپوریان (Araceae) است (رئیزی و همکاران، ۱۳۹۶). عصاره کارده شامل ترکیباتی نظیر فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، آلکالوئیدها، آمین‌ها، ساپونین‌ها و اسیدهای سینامیک است (محمودی و همکاران، ۱۳۹۷). گیاه بن‌سرخ (*Allium jesdianum*) از خانواده Amaryllidaceae گیاهی پیازی با برگ‌هایی شبیه تره است؛ عصاره بن‌سرخ حاوی ترکیبات فنلی، توپترنوئیدها، لوسین‌ها و ترکیبات سولفیدی است (Amiri, 2007). این پژوهش با هدف بررسی اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهان اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ بر بیمارگر شانکر باکتریایی درخت بادام (*P. syringae* pv. *syringae*) در شرایط آزمایشگاه بر روی محیط کشت Nutrient Agar انجام شد.

مواد و روش‌ها

محل و مشخصات آزمایش

این آزمایش در آزمایشگاه گیاه‌شناسی، در شهرستان اردکان، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه اردکان انجام شد. تیمارهای مورد استفاده عصاره‌های اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ بودند، که بعد از جمع‌آوری برگ این گیاهان از ارتفاعات استان چهارمحال و بختیاری و خشک کردن، برای انجام عملیات عصاره‌گیری و بررسی تأثیر آن‌ها بر عامل بیمارگر شانکر باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی به آزمایشگاه گیاه‌شناسی منتقل شدند.

نمونه برداری و جداسازی باکتری عامل بیماری شانکر باکتریایی در باغ

نمونه برداری و جداسازی باکتری از باغات بادام واقع در مناطق مختلف ار شهرستان سامان، استان چهارمحال و بختیاری صورت گرفت. درختانی که دارای علائم شانکر باکتریایی و لکه برگی، مورد بررسی قرار گرفته و نمونه هایی از بافت های آلوده در قسمت های برگ، تنه، شاخه و سرشاخه جمع آوری شدند و در نهایت دقت، در داخل پاکت های کاغذی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه ها در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای جداسازی باکتری، ابتدا در زیر جریان آب معمولی برگ های دارای علائم لکه برگی نکروزه و شاخه های دارای شانکر شسته شدند و سپس در محلول هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت سه دقیقه قرار گرفتند، سپس دو بار در زیر آب مقطر سترون شست و شو انجام گرفت و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. از حد فاصل بافت سالم و آلوده برگ و حاشیه شانکر روی شاخه قطعات کوچک یک الی دو سانتی متری جدا و در پتری دیش به وسیله تیغ اسکالپل سترون خرد گردید و چند قطره آب مقطر سترون به آن ها اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، یک لوپ از هر یک از سوسپانسیون های باکتریایی برداشته شد و بر روی محیط کشت آگار همراه با پنج درصد سوکروز (NAS) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. تک پرگنه های محدب به رنگ کرم و سفید انتخاب و مجدداً روی محیط کشت آگار خالص سازی گردید؛ از این نمونه ها برای آزمایشات بیوشیمیایی و تشخیص باکتری استفاده شد.

آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه ای

کلیه جدایه ها در آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه ای بررسی شدند. تعیین واکنش گرم، تولید رنگدانه فلورسنت، فعالیت کاتالاز، تولید اوره آز، احیای نیتрат، توانایی رشد در دماهای ۳۵ و ۳۱ درجه سلسیوس، هیدرولیز نشاسته و توئین ۸۰، آزمون توانایی استفاده از برخی منابع هیدروکربنی، آزمون LOPAT (تولید لوان، اکسیداز، فعالیت پکتولیتیکی، تولید آرژنین دی هیدرولاز و واکنش فوق حساسیت روی شمعدانی)، آزمون GATTa (ذوب ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، فعالیت تیروزیناز و استفاده از تارتارات)، رشد هوازی/بی هوازی، تحمل رشد در نمک طعام به همراه سایر آزمون های رایج با استفاده از روش های متداول در باکتری شناسی گیاهی انجام شد (احسنی و همکاران، ۱۳۹۸).

تهیه عصاره های گیاهی

گیاهان مورد استفاده در این بررسی شامل اسطوخودوس، کارده و بن سرخ، از رویشگاه طبیعی در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری شدند. گیاهان مورد نظر در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک و پس از آسیاب کردن از الک مش ۱۴ عبور داده شدند (Abdul-Aziz et al., 2010). تهیه عصاره گیاهی به دو روش استفاده از حلال اتانول و آب انجام شد. در روش استفاده از اتانول، ۵۰ گرم ماده خشک به حجم ۵۰۰ میلی لیتر اتانول (شرکت Merk) رسانده شد و بعد از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در فضای آزمایشگاه، به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام زمان مورد نظر، محلول های حاصل توسط پارچه ملل صاف و در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲۰۰ میلی لیتر از محلول رویی به یک استوانه مدرج منتقل و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شده به آن اضافه شد تا به حجم ۲۵۰ میلی لیتر برسد، سپس هم حجم آن هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار گرفت، سپس بخش های مختلف به کمک دکانتور جدا شد و بخش اتانولی جهت تبخیر اتانول زیر هود قرار داده شد (Bahraminejad et al., 2008). در روش استفاده از آب، ۵۰ گرم از ماده خشک گیاهی به حجم ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر رسانده شد و بعد از ۴۸ ساعت از پارچه ملل عبور داده شد و سپس سانتریفیوژ گردید (عطایی عظیمی و همکاران، ۱۳۸۵).

بررسی تأثیر عصاره های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

به منظور بررسی تأثیر عصاره های گیاهی بر رشد باکتری بیمارگر از روش اختلاط با محیط کشت استفاده گردید. این آزمایش با تیمار (سه عصاره آبی و سه عصاره اتانولی در غلظت های ۵۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ ppm، هر کدام در سه تکرار) و تیمار شاهد (عامل بیماری بر روی محیط کشت بدون عصاره)، در دمای اتاق ۲۵ درجه سلسیوس در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد (Gholamnezhad et al., 2016). در ابتدا محلول های پایه تهیه شده از عصاره های آبی و اتانولی

اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ به‌عنوان غلظت ۱۰۰ درصد عصاره در نظر گرفته و بر این اساس غلظت‌های مناسب در مقیاس میکرولیتر تهیه شد. محیط کشت NA (Nutrient Agar) در دستگاه اتوکلاو به‌مدت ۲۰ دقیقه تحت فشار یک اتمسفر و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس ضدعفونی شد، سپس ظرف محیط کشت در دمای اتاق قرار داده شد تا دمای آن به حدود ۴۵ درجه سلسیوس برسد، سپس داخل هر پتری دیش هشت سانتی‌متری ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت NA اضافه شد. با استفاده از سمپلر، مقادیر مشخصی عصاره (میکرولیتر) به روش اختلاط به محیط کشت اضافه و عامل بیماری به میزان ۵۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت NA قرار داده شد؛ هر میلی‌لیتر حاوی 10^8 باکتری، که این غلظت با استفاده از محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و درصد بازدارندگی رشد باکتری هر تیمار، بعد از یک هفته با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Gholamnezhad, 2019).

$$100 \times \frac{\text{قطر هاله در تیمار} - \text{قطر هاله در شاهد}}{\text{قطر هاله در شاهد}} = \text{درصد بازدارندگی در محیط کشت}$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل در آزمایش به کمک نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) مورد بررسی قرار گرفت. اثر تیمارها با تجزیه واریانس (ANOVA) آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام گرفت.

نتایج

نتایج آزمون بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها

تمامی جدایه‌ها در آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین واکنش گرم، آزمون رشد هوازی/بی‌هوازی، واکنش حساسیت، تولید رنگدانه فلورسنت، تولید لوان، آزمون کاتالاز، لپانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین، تحمل نمک طعام، تولید گاز از گلوکز و هیدرولیز اسکولین و سایر آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای با استفاده از روش‌های متداول در باکتری‌شناسی گیاهی انجام گردید (جدول ۱).

تأثیر بازدارندگی عصاره‌های آبی گیاهی بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* در شرایط آزمایشگاه

در آزمایشگاه هر سه عصاره‌های آبی اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm اثر بازدارندگی بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* از خود نشان دادند (جدول ۲ و ۳). بهترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره آبی اسطوخودوس با غلظت ۲۰۰۰ ppm با اثر بازدارندگی ۸۲/۴۵ درصد بود و بعد از آن مربوط به عصاره اسطوخودوس با غلظت ۱۵۰۰ ppm با اثر بازدارندگی ۷۰/۶۵ درصد بود. عصاره آبی بن‌سرخ با غلظت ۵۰۰ ppm با اثر بازدارندگی ۲۹/۶۸ درصد کم‌ترین اثر بازدارندگی را بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* در شرایط آزمایشگاه داشت. هر سه عصاره آبی گیاهی اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ در شرایط آزمایشگاه اثر بازدارندگی از خود نشان دادند، که به ترتیب عملکرد از لحاظ درصد بازدارندگی عصاره آبی اسطوخودوس به نسبت عصاره‌های آبی کارده و بن‌سرخ در سطح بالاتری قرار داشت. تمامی عصاره‌های آبی در هر سه غلظت نسبت به شاهد بهتر بودند.

تأثیر بازدارندگی عصاره‌های اتانولی گیاهی بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* در شرایط آزمایشگاه

در آزمایشگاه هر سه عصاره‌های الکلی اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm اثر بازدارندگی بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* از خود نشان دادند (جدول ۴ و ۳). بهترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره اتانولی اسطوخودوس با غلظت ۲۰۰۰ ppm با اثر بازدارندگی ۸۴/۱۲ درصد بود و بعد از آن مربوط به عصاره اتانولی اسطوخودوس با غلظت ۱۵۰۰ ppm با اثر بازدارندگی ۸۰/۲۶ درصد بود. عصاره اتانولی بن‌سرخ با غلظت ۵۰۰ ppm با اثر بازدارندگی ۳۴/۱۲ درصد کم‌ترین اثر بازدارندگی را بر روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* در شرایط آزمایشگاه داشت. هر سه عصاره اتانولی گیاهی اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ در شرایط آزمایشگاه اثر بازدارندگی از خود نشان

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* جدا شده از درختان بادام در شهرستان سامان

Table 1. Biochemical and phenotypic test results of *P. syringae* pv. *syringae* isolates from almond trees in Saman County

نتیجه Results	Test	آزمون	نتیجه Results	Test	آزمون
v	Gelatin Hydrolysis	هیدرولیز ژلاتین	-	Gram Reaction	واکنش گرم
-	Starch	نشاسته	-	Oxidase	اکسیداز
+	Tween 80	توئین ۸۰	+	Levan Production	تولید لوآن
-	Casein	کازئین	-	Potato Rot	لهانیدن سیب زمینی
v	Esculin	اسکولین	+	Hypersensitivity Reaction	واکنش فوق حساسیت
-	Lecithinase	لسیتیناز	-	Arginine Dihydrolase	آرژنین دهیدرولاز
+	Catalase	کاتالاز	-	Growth at 39°C	رشد در دمای ۳۹°C
+	Phosphatase	فسفاتاز	+	Growth at 4°C	رشد در دمای ۴°C
-	Tolerance to 7% NaCl	تحمل نمک طعام ۷ درصد	-	H ₂ S Production from Cysteine	تولید H ₂ S از سیستئین
+	Tolerance to 5% NaCl	تحمل نمک طعام ۵ درصد	-	H ₂ S Production from Peptone	تولید H ₂ S از پپتون
-	Indole Acetic Acid Production	تولید ایندول استیک اسید	-	H ₂ S Production from Sodium Thiosulfate	تولید H ₂ S از تیوسولفات سدیم
+	Fructose	فروکتوز	-	Nitrate Reduction	احیای نیترات
+	Mannitol	مانیتول	+	Aerobic growth	رشد هوازی
+	Citrate	سیترات	-	Anaerobic growth	رشد بی هوازی
+	Arabinose	آرابینوز	+	Mannose	مانوز
-	Tyrosinase	تیروزیناز	+	Urease	اوره آز
-	Trehalose	تری هالوز	-	Methyl Red	متیل رد
-	Raffinose	رافینوز	+	Galactose	گالاکتوز
+	Cellobiose	سلوبیوز	-	Ketolactose	کتولاکتوز
-	Inositol	اینوزیتول	+	Glucose Utilization	استفاده از گلوکز
+	Rhamnose	رامنوز	+	Sucrose	سوکروز
-	Lactose	لاکتوز	+	Sorbitol	سوربیتول

+: واکنش جدایه‌ها مثبت بود، -: واکنش جدایه‌ها منفی بود، v: واکنش جدایه‌ها متغیر بود.

+: Reaction of isolates was positive, -: Reaction of isolates was negative, v: Reaction of isolates was variable.

دادند، که به ترتیب عملکرد از لحاظ درصد بازدارندگی عصاره اتانولی اسطوخودوس به نسبت عصاره‌های اتانولی کارده و بن‌سرخ در سطح بالاتری قرار داشت. تمامی عصاره‌های اتانولی در هر سه غلظت در مقایسه با شاهد عملکرد بهتری از خود نشان دادند.

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* بر اثر عصاره‌های آبی گیاهی در محیط کشت NA

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of the inhibition percentage of *P. syringae* pv. *syringae* by aqueous plant extracts on NA culture medium

F	میانگین مربعات Mean Squares (MS)	درجه آزادی Degrees of Freedom (df)	منبع تغییرات Source of Variation (S.O.V)	تیمار
56.9**	23.87	9	Treatment	تیمار
	12.9	20	Experimental Error	خطای آزمایش
		29	Total	کل

**اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۹ درصد ($p \geq 0.01$). C.V. = ۴/۶۵٪

** Significant difference at 99% probability level ($p \leq 0.01$); C.V (Coefficient of Variation)= 4.65%

بحث

کشور ایران جزء کشورهای تولیدکننده غالب بادام قرار دارد و این محصول جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات باغی کشور دارد؛ یکی از قطب‌های اقتصادی کشت بادام در ایران، استان چهارمحال و بختیاری است. آفات و بیماری‌های زیادی موجب کاهش عملکرد و کیفیت درخت بادام می‌شوند که بیماری شانکر باکتریایی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاهی است؛ این بیماری باعث ضعف شدید درخت، خشک شدن شاخه، بلاست شکوفه و در موارد شدید، باعث خشک شدن

کامل درخت می‌شود. مهم‌ترین راه حل برای مقابله با این بیماری استفاده از سموم شیمیایی مسی مانند مخلوط بردو است که علاوه بر خاصیت گیاه‌سوزی و از بین بردن میکروارگانیسم‌های خاک برای سلامتی انسان نیز مضر هستند؛ همچنین باعث ایجاد مقاومت در جمعیت باکتری‌های خاکزی می‌شود (اطمینانی و اطمینانی، ۱۳۹۹).

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* بر اثر عصاره‌های آبی گیاهی در محیط کشت NA

Table 3. Comparison of mean inhibition percentage of *P. syringae* pv. *syringae* by aqueous and ethanol plant extracts in NA culture medium

تیمارها و غلظت (ppm)	میانگین بازدارندگی *	Mean Inhibition (%)*
Treatments and concentration (ppm)	عصاره آبی	عصاره اتانولی
اسطوخودوس ۵۰۰	Lavender 500	72.20 c
اسطوخودوس ۱۵۰۰	Lavender 1500	80.26 ab
اسطوخودوس ۲۰۰۰	Lavender 2000	84.12 a
کارده ۵۰۰	Biarum 500	48.15 f
کارده ۱۵۰۰	Biarum 1500	48.24 ef
کارده ۲۰۰۰	Biarum 2000	52.12 de
بن سرخ ۵۰۰	Michael Hoog 500	23.18 i
بن سرخ ۱۵۰۰	Michael Hoog 1500	36.22 hi
بن سرخ ۲۰۰۰	Michael Hoog 2000	38.49 gh
شاهد	Control	k

حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بین تیمارهای مورد مطالعه است.

Different letters indicate significant differences at the 1% level among the treatments.

جدول ۴- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* بر اثر عصاره‌های الکلی گیاهی در محیط

کشت NA

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) of the inhibition percentage of *P. syringae* pv. *syringae* by ethanol plant extracts in NA culture medium

منبع تغییرات	Source of Variation (S.O.V)	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
		Degrees of Freedom (df)	Mean Squares (MS)	
تیمار	Treatment	9	16.94	82.12**
خطای آزمایش	Experimental Error	20	34.7	
کل	Total	29		

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۹۹ درصد؛ $Cv = 3.12\%$

** Significant difference at 99% probability level ($p \leq 0.01$); $Cv = 3.12\%$

با وجود تنوع در پوشش گیاهی و بخصوص گیاهان بومی دارویی زیاد در کشور با خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی، می‌توان از آن‌ها در گیاه‌پزشکی به‌عنوان جایگزین سموم شیمیایی استفاده نمود. استفاده از ترکیبات گیاهی مانند عصاره‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین مناسب ترکیبات شیمیایی که برای انسان مفید بوده و خاصیت گیاه‌سوزی نیز ندارند، روشی مناسب برای مدیریت بیماری‌های گیاهی است.

در آزمایش بیوشیمیایی پژوهش حاضر تست واکنش گرم و اکسیداز منفی بودن، همچنین تست کاتالاز و تست رشد در دمای چهار درجه سلسیوس این باکتری مثبت بود. در پژوهش مشابهی تست کاتالاز باکتری *Pseudomonas grimontii* مثبت بود، نتیجه تست رشد در دمای چهار درجه سلسیوس نیز مثبت بود (آشنگرف و معتصم زوراب، ۱۴۰۱). نتایج آزمون بیوشیمیایی و تست‌های جدایه‌های باکتری این پژوهش با پژوهش مشابه روی باکتری *P. syringae* pv. *syringae* درختان بادام، مشابه بود (Lopez et al., 2009). در پژوهشی بررسی‌ها نشان داد جدایه‌های

باکتری *P. syringae* pv. *syringae* از روی نیشکر، درختان هسته‌دار و گندم خصوصیات مشابهی دارند (موسیوند و همکاران، ۱۳۸۸). نتایج پژوهش بررسی خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. syringae* pv. *syringae* عامل شانکر باکتریایی بادام در استان خراسان رضوی با نتایج پژوهش حاضر مشابه بود (احسنی و همکاران، ۱۳۹۴)؛ همچنین نتایج پژوهش حاضر با پژوهش سماواتیان (Samavatian, 2006) مشابه بود.

نتایج آزمون اختلاط در محیط کشت نشان دادند، به‌طور کلی با افزایش غلظت عصاره‌ها، میزان فعالیت ضدباکتری افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان فعالیت ضدباکتریایی در آزمون اختلاط با محیط کشت (هر دو عصاره الکلی و آبی) مربوط به غلظت‌های ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm مشاهده شد. پژوهش‌های متعددی نشان می‌دهد، که ترکیبات طبیعی در گیاهان توانایی جلوگیری و کاهش فعالیت بیمارگرها را دارند؛ از جمله مهم‌ترین این مواد می‌توان به آلکالوئید، فلاونوئید و ساپونین اشاره کرد (Shariatifar et al., 2014). گیاهان در هنگام پاسخ به آلودگی میکروبی ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها می‌سازند که دارای تأثیرات قابل توجهی بر روی میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها هستند. فلاونوئیدها به‌علت چربی‌دوست بودن، باعث اختلال در غشا و دیواره سلول‌های قارچ‌ها می‌شوند (Schwartz et al., 2009)؛ همچنین در گیاهان بعد از حمله بیمارگرها ترکیبات ثانویه ساپونین‌ها که به‌صورت پیش‌ماده‌های غیرفعال هستند، به آنتی‌بیوتیک‌های فعال زیستی تبدیل شده و از گیاه محافظت به‌عمل می‌آورند (Soylu et al., 2007). از بین این ترکیبات، اسید فنولیک‌ها از مهم‌ترین و فراوان‌ترین ترکیب‌های محلول در آب بوده که ویژگی بازدارندگی آن‌ها در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (Sodaeizadeh et al., 2010)؛ بنابراین بسیاری از این گیاهان به‌دلیل داشتن چنین خصوصیتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این‌رو به‌دلیل تنوع ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی، نوع حلال مورد استفاده نقش مهمی در استحصال آن ترکیب بازی می‌کند. بر اساس نتایج به‌دست آمده در بین عصاره‌های آبی و اتانولی، عصاره اتانولی در جلوگیری از رشد بیمارگر با تأثیر بیشتر ظاهر شد. لازم به ذکر است اتانول به تنهایی خاصیت ضد میکروبی دارد. تأثیر بازدارندگی عصاره علاوه بر نوع حلال مورد استفاده برای استخراج، به غلظت عصاره نیز بستگی دارد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد افزودن ترکیبات ضد میکروبی به محیط کشت (عصاره‌های گیاهی) باعث کنترل باکتری بیمارگر گردید. نتایج حاضر با نتایج پژوهش ده مرده و همکاران (۱۳۹۶) هم‌خوانی داشت. در مطالعات آن‌ها عصاره‌های آبی و اتانولی آویشن زوفایی، آویشن کرک آلود، مرزه خوزستانی و لعل کوهستانی باعث کاهش رشد بیمارگر *Alternaria solani* در شرایط آزمایشگاهی شد. با توجه به مطالعات قبلی انجام شده (غلام‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲؛ Gholamnezhad, 2019) نشان داده شده است که فعالیت ضدقارچی عصاره‌های گیاهی به ترکیبات آن‌ها بستگی دارد، به‌طوری‌که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به‌صورت ترکیبی با سایر ترکیبات در غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ و خاصیت قارچ‌کشی آن نقشی کلیدی داشته‌باشد (Chaieb et al., 2012).

در پژوهشی بر روی اثر عصاره مرزه، رزماری و اسطوخودوس بر بازدارندگی باکتری *Rhizobium radiobacter*، اسطوخودوس با ۱۰۰ درصد بازدارندگی بیشترین اثر بازدارندگی و بعد از آن مرزه با ۹۹/۶ و رزماری با ۹۹/۵ درصد اثر مطلوبی بر جا گذاشتند (اطمینانی و اطمینانی، ۱۳۹۹). در مطالعه بر روی اثر بازدارندگی اسانس اسطوخودوس روی دو باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی، نتایج نشان از فعالیت ضدباکتریایی این اسانس در شرایط آزمایشگاهی داد (احمدی اسب چین و مصطفی‌پور، ۱۳۹۷). اسانس و عصاره اسطوخودوس حاوی ترکیبات فعال زیستی مانند ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی هستند (حناچی و همکاران، ۱۴۰۱). اثرات درمانی فراوان از این گیاه، همچون خواص آرام‌بخشی، ضداسپاسم، ضدویروسی، ضدانگلی، آنتی‌باکتریال، ضددردی، حفاظت از دستگاه گوارشی، ضدالتهاپی، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌موتازنیکی، ضدسرطان، ضداضطرابی، ضدافسردگی و ممانعت از تشکیل لخته توسط محققان گزارش شده است (عزت‌پور و همکاران، ۱۳۸۷). در پژوهشی با هدف بررسی اثر ضدقارچی فرمولاسیون سه اسانس زیره سبز، زیره سیاه، اسطوخودوس و پوشش‌های حاوی این اسانس‌ها بر پایه مالتودکسترین، علیه *Fusarium oxysporum*، نتایج فعالیت ضدقارچی اسانس‌ها علیه رشد میسلیوم برتری نسبی اسانس زیره سیاه را نسبت به دو اسانس دیگر نشان داد. پوشش حاوی اسانس زیره سیاه توانست با مهار ۷۹/۳۷ درصدی رشد قارچ بر روی میوه تلقیح شده، بهترین عملکرد را نشان

دهد. در حالی که پوشش‌های حاوی اسانس‌های زیره سبز و اسطوخودوس ۷۱/۴۳ و ۳۸/۰۹ درصد مهار نشان دادند؛ نتایج نشان داد پوشش حاوی اسانس زیره سیاه دارای اثر ضدقارچ قوی است، که می‌توان از آن با هدف افزایش طول انبارمانی و حفظ کیفیت میوه‌های گوجه‌فرنگی استفاده کرد (دهقان و همکاران، ۱۴۰۳). در پژوهشی مهار دو گونه قارچ فوزاریوم توسط اسانس گیاهان دارویی انجام شد، که کمترین و بیشترین درصد بازدارندگی اسانس اسطوخودوس ۸۸/۵ درصد و ۱۰۰ درصد به ترتیب در قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Fusarium solani* مشاهده گردید (معراجی و همکاران، ۱۳۹۷).

استفاده از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان یک روش طبیعی و ایمن برای کنترل بیماری‌های گیاهی در سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. زنگویی و همکاران (۱۳۹۷) در مطالعه‌ای بر روی عصاره اسطوخودوس (*L. angustifolia*) نشان دادند که این عصاره می‌تواند به‌طور مؤثری از رشد قارچ عامل بیماری کپک آبی جلوگیری کند. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیبات فنولی موجود در عصاره اسطوخودوس با ایجاد اختلال در ساختار دیواره سلولی قارچ، مانع از رشد و گسترش آن می‌شوند. این پژوهش پیشنهاد کرد که عصاره اسطوخودوس می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین طبیعی برای سموم شیمیایی در کنترل بیماری‌های قارچی استفاده شود. اسطوخودوس به‌دلیل ترکیبات فعالی مانند لینالول و لینالیل استات، خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که اسطوخودوس می‌تواند در کنترل قارچ‌های بیمارگر گیاهی مانند *Botrytis cinerea* (عامل بیماری پوسیدگی خاکستری) مؤثر باشد. در یک مطالعه، اسانس اسطوخودوس توانست رشد قارچ *B. cinerea* را به‌طور قابل توجهی مهار کند (Zuzarte et al., 2018).

سیر با نام علمی *Allium sativum* از گونه‌های بسیار نزدیک به بن‌سرخ نیز به‌دلیل ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی، خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی دارد. این گیاه می‌تواند در کنترل بیمارگرهایی مانند *Alternaria alternata* (عامل بیماری لکه‌برگی آلترناریایی) مؤثر باشد. در یک مطالعه، عصاره سیر توانست رشد قارچ *A. alternata* (عامل ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای) را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (Bachir et al., 2020). علاوه بر خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی مستقیم، عصاره سیر معمولی می‌تواند سیستم دفاعی گیاهان را نیز تحریک کند. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از این عصاره باعث افزایش تولید ترکیبات دفاعی مانند فیتوالکسین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌شود. این ترکیبات به گیاهان کمک می‌کنند تا در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف مقاومت بیشتری داشته باشند. بنابراین، عصاره بن‌سرخ را نیز می‌توان به‌عنوان یک گونه بسیار نزدیک به *A. sativum* نه تنها به‌عنوان یک عامل کنترل مستقیم بیماری‌ها، بلکه به‌عنوان یک محرک زیستی برای افزایش مقاومت گیاهان نیز استفاده نمود (Bachir et al., 2020).

در مطالعات اخیر اثر ضددردی بن‌سرخ به اثبات رسید؛ استروئیدهای موجود در پیاز آن نیز اثرات سایتوتوکسیک و سایتواستاتیک علیه سلول‌های توموری بدخیم از خود نشان داده‌اند (Atmani et al., 2009). در مطالعه‌ای به بررسی اثر ضددردی و مواد متشکله عصاره برگ گیاه دارویی بن‌سرخ و نقش احتمالی سیستم اپیوئیدی در اثرات ضددردی آن، ترکیبات تشکیل‌دهنده این گیاه تعیین گردید؛ علاوه بر ترکیبات کینولین و بنزن دارای ترکیبات مرفین نیز بود؛ نتایج این مطالعه نشان داد، که عصاره بن‌سرخ دارای اثر ضددردی است (خاکسریان و همکاران، ۱۳۸۶). در مطالعه‌ای، که بر روی تجزیه اسانس روغنی این گیاه انجام گرفت مشخص شد، که ترکیبات سولفیدی و ترپنوئیدی بخش اصلی اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهند (Amiri, 2007). عصاره آبی گیاه بن‌سرخ نسبت به عصاره متانولی تأثیر بهتری را نشان داد، زیرا در MIC پایین‌تری سبب مهار رشد باکتری‌ها می‌شود و در مقایسه با اثر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین چون عصاره‌ها بر روی سویه‌های XDR نیز تأثیر داشتند، از این‌رو عصاره‌های این گیاه اثر ضدباکتریایی خوبی را نشان دادند؛ داشتن حساسیت یکسان بین سویه‌های مقاوم و استاندارد نسبت به این عصاره‌ها در همه باکتری‌ها (به‌جز در *Pseudomonas aeruginosa*) نمایانگر این موضوع است، که مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی با این عصاره واکنش متقاطع ندارد و می‌توان برای استفاده از ترکیبات ضدباکتریایی این گیاه در درمان عفونت‌ها، به‌خصوص عفونت با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک استفاده نمود (غلامی و همکاران، ۱۳۹۵). محسن‌زاده در مقاله مروری خود، موارد

متعددی از اثرات آنتی-باکتریال و ضدقارچی عصاره *A. jesdianum* را به خصوص بر روی *P. aeruginosa* گزارش نمود که با یافته‌های حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (Mohsenzadeh, 2024).

در پژوهشی استفاده از عصاره اتانولی گیاه بن‌سرخ *A. jesdianum* با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر مثبتی روی پاسخ هومورال موش‌های آلوده با باکتری داشت؛ درحالی‌که که عصاره گیاه بن‌سرخ با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر منفی را بر روی پاسخ هومورال موش‌ها داشت (Rahimi and Madani, 2015). در پژوهشی نشان داده شد، که عصاره آبی بن‌سرخ به‌عنوان یک عامل ایمنومدولاتور روی پاسخ سلول‌های بنیادی نخاع به سمت تولید سیتوکین اینترلوکین ۴ و کاهش تولید سیتوکین‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۱۷ تأثیر مثبت دارند (Radjabian et al., 2022). در مطالعه‌ای معلوم شد، که عصاره آبی پیاز بن‌سرخ می‌تواند توانایی سلول‌های ماکروفاژ برای تولید سیتوکین‌های التهابی را تحریک کند (Naeini et al., 2020). حجتی و عزیزاده بهبهانی (۱۴۰۰) خواص ضدباکتری و ضدقارچی عصاره بن‌سرخ را به وجود ترکیبات فنلی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد تشکیل‌دهنده عصاره بن‌سرخ نسبت دادند؛ ایشان در مطالعات خود، راندمان بازدارندگی عصاره متانولی بن‌سرخ را در مهار باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی بیشتر از عصاره آبی بیان نمودند (حجتی و عزیزاده بهبهانی، ۱۴۰۰). Bhat (2021) نیز ترکیبات متشکله در عصاره بن‌سرخ را مجموعه‌های متنوعی از ترکیبات آلی گوگرددار، تیوسولفینات‌ها، پلی‌سولفان‌ها، پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فروکتان‌ها، فروکتو-الیگوساکاریدها، روغن‌ها، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و رنگدانه‌ها معرفی نموده و ترکیبات سازنده عصاره بن‌سرخ را فعال زیستی دانست.

در مطالعه‌ای اثر بازدارندگی و کشندگی عصاره کارده *Biarum carduchorum* بر روی *Aspergillus* و *Penicillium* به اثبات رسیده است (Tabatabayee Yazdi et al., 2016) که با یافته‌های حاصل از این تحقیق در ارتباط با اثر کشندگی عصاره کارده بر روی *P. syringae* pv. *syringae* مطابقت دارد. وکیلی و همکاران نیز نتایج مشابهی در ارتباط با عصاره کارده به‌دست آوردند. نتایج تحقیقات این محققین نشان داد که عصاره کارده برعلیه *Enterococcus faecalis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* آنتی‌بیوتیکی است (Vakili et al., 2022). این تحقیق با یافته‌های تحقیق حاضر مبنی بر اثربخشی عصاره کارده برعلیه *P. syringae* pv. *syringae* مطابقت دارد. اثر کشندگی عصاره گیاه دیگری از جنس بیاروم با نام *Biarum bovei* بر روی باکتری‌های بیمارگر به اثبات رسیده است (Wahab et al., 2023). اکبری و همکاران (۱۳۹۵) اثر عصاره کارده گونه *B. bovei* را بر میزان تفریح تخم و بقا لاروهای قزل‌آلای رنگین‌کمانی بررسی نموده و نتیجه گرفتند که تیمار تخم‌ها با عصاره کارده باعث افزایش نرخ تفریح تخم‌ها و افزایش شانس زنده‌مانی لاروها خواهد شد. این محققین علت بروز چنین پدیده‌ای را خاصیت آنتی‌باکتریایی عصاره کارده و کاهش شانس استقرار باکتری‌های بیمارگر نظیر *E. coli* اعلام نمودند. در مطالعه دیگری عصاره هیدروالکلی برگ کاردین (کارده) گونه *B. bovei* برعلیه *P. aeruginosa* مورد استفاده قرار گرفت و نشان داده شد که عصاره این گیاه در غلظت‌های کم تا زیاد خاصیت باکتری‌کشی دارد؛ البته با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد باکتری افزایش یافت. همین تحقیق خاصیت باکتری‌کشی عصاره کارده را بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بیان نمود (کردجی و فرهنگدفر، ۱۳۹۸)؛ یافته‌های این تحقیق نیز مانند تحقیقات مشابه نشان‌دهنده خاصیت باکتری‌کشی گیاهان جنس *Biarum* بوده و لذا یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر به‌عنوان اولین مطالعه بر روی اثر باکتری‌کشی عصاره کارده بر روی باکتری‌های بیمارگر گیاهی، را می‌توان تأیید نمود.

نتیجه‌گیری

در این مقاله اثر بازدارندگی و خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی اسطوخودوس، کارده و بن‌سرخ در برابر باکتری *Pseudomonas syringae* در شرایط آزمایشگاه بررسی گردید. یافته‌ها نشان داد که عصاره‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش خاصیت بازدارندگی علیه باکتری عامل بیماری شانکر باکتریایی در شرایط آزمایشگاه داشتند، لذا با یافتن فرمولاسیون‌های ترکیبات گیاهی مانند عصاره‌ها می‌توان به‌عنوان ترکیبات جایگزین ترکیبات شیمیایی که خاصیت گیاه‌سوزی کمتر، خطرات زیست‌محیطی کمتر و تضمین‌کننده سلامت انسان و محیط‌زیست هستند، استفاده نمود.

References

منابع

- آشنگر ف، م. و معتصم زوراب، م. ۱۴۰۱. سنتز سبز نانوذرات مس توسط باکتری سودوموناس گرموننتی و تعیین ویژگی و فعالیت ضدباکتریایی آن. زیست‌شناسی میکروبی ۱۱(۴۱): ۶۱-۷۹.
- احسنی، ح.، محمودی صفا، ج.، نصراله‌نژاد، س. و رحیمیان، ح.ا. ۱۳۹۸. تعیین خصوصیات فنوتیپی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار در استان‌های خراسان رضوی و شمالی. آفات و بیماری‌های گیاهی ۸۷(۱۰۹): ۱۹۳-۱۸۱.
- احمدی اسب‌چین، س. و مصطفی‌پور، م.ج. ۱۳۹۷. اثرات متقابل ضدباکتریایی اسانس رزماری و اسانس اسطوخودوس بر روی دو باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی در محیط آزمایشگاهی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۱(۲): ۱۳۶-۱۲۱.
- اطمینانی، ف. و اطمینانی، ا. ۱۳۹۹. فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های هیدروالکلی گیاه آویشن و به‌لیمو بر باکتری *Pseudomonas syringae* در شرایط آزمایشگاهی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست‌شناسی ایران) ۳۳(۲): ۱۳۶-۱۴۳.
- اکبری، پ.، فریدونی، م.س. و غلام حسینی، ا. ۱۳۹۵. اثر عصاره‌های کارده *Biarum bovei* و جفت گیاه بلوط *Quercus infectaria* بر درصد تخم‌گذاری و بقا لارو قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* در مراحل اولیه رشد. مجله تحقیقات دامپزشکی ۷۱(۳): ۴۰۷-۴۰۳.
- باساوند، ا.، خدایگان، ص.، رحیمیان، ح.، بابایی‌زاد، و. و میرحسینی، ح.ع. ۱۳۹۰. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به‌عنوان عامل جدید بیماری سوختگی برگ کلم. مجله آسیب‌شناسی گیاهی ۱۶۹(۴): ۲۵۹-۲۵۳.
- بیله رام، س.، رومیانی، ل. تدینی، م. ۱۳۹۷. تأثیر پوشش کیتوزان و اسانس فلفل سیاه بر ماندگاری فیله کپور علف‌خوار در بسته‌بندی اتمسفر تغییر یافته. علوم و فنون شیلات ۷(۳): ۱۷۴-۱۶۷.
- حجتی، م. و عزیززاده بهبهانی، ب. ۱۴۰۰. بررسی اثر روش استخراج با حلال‌های آب و متانول بر ویژگی‌های ضدآکسایشی و ضد میکروبی عصاره گیاه بن‌سرخ: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی. ۱۷(۱): ۹۱-۸۳. <https://doi.org/10.22067/ijfst.v17i1.85992>
- حسینی، ا.، روستا، ع.، طبیب لقمانی، ف.ا. و محمودپور، م.ب. ۱۳۹۳. فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی عصاره هیدرومتانولی گیاه کارده (*Biarum carduchorum*) در شرایط آزمایشگاهی و تأثیر آن بر لیپیدهای سرم موش‌های صحرایی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران ۹(۳): ۸-۱.
- حناچی، پ.، قربانی، ن.، صادقی علی‌آبادی، ح.، کیارستمی، خ. و حسینی، ف.س. ۱۴۰۱. سنجش میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره گیاهان بادرنجبویه و اسطوخودوس با استفاده از حلال‌ها و روش‌های عصاره‌گیری مختلف و بررسی خواص ضدباکتریایی آن‌ها. نوید نو ۲۵(۸۲): ۴۹-۳۸.
- خاکسریان، م.، مشکوه السادات، م.ه.، فرازی فرد، ر. و صفرپور، ف. ۱۳۸۶. بررسی اثر ضدردی و مواد متشکله عصاره برگ گیاه دارویی بن‌سرخ *Allium jesdanum* و نقش احتمالی سیستم اپوپتوزی در اثرات ضدردی آن. یافته ۹(۴): ۲۶-۲۱.
- ده مرده، ص.، سالاری، م.، پیرنیا، م. و افضلی گروه، ص. ۱۳۹۶. بررسی خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی اسانس و عصاره برخی از گیاهان دارویی بر بیمارگرهای گیاهی. دوازدهمین همایش ملی پژوهش‌های نوین در علوم و فناوری.

- دهقان، ح.، هاشمی، س.ع.ا. و طباطبایی، س.ج. ۱۴۰۳. بررسی فیتوشیمیایی اسانس‌های زیره سبز، زیره سیاه و اسطوخودوس و اثر آن‌ها علیه قارچ بیماری‌زای گوجه‌فرنگی *Fusarium oxysporum*. شیمی کاربردی روز ۱۹ (۷۰): ۲۶۰-۲۴۳.
- رئیزی، م.، شکر فروش، س.ش.، امین‌لاری، م.، قیصری، ح.ر. و گلکاری، ح.ا. ۱۳۹۶. بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کالباس امولسیون تولید شده با گوشت ترد شده توسط عصاره آبی گیاه کارده (*Biarum carduchcorum*). بهداشت مواد غذایی ۷، ۲ (۲۶): ۵۷-۶۶.
- زنگویی، ا.، بازگیر، ع.، غلام‌نژاد، ج.، و درویش‌نیا، م. ۱۳۹۷. مطالعه اثر عصاره اسطوخودوس (*Lavandula spica* L.) بر روی بیماری کپک آبی. اولین همایش ملی علوم کشاورزی و زیست‌محیطی ایران، باوی.
- سرمیلی، ع.، لرستانی، ع.ن. و عقیلی ناطق، ن. ۱۴۰۲. تشخیص خلال بادام درختی از خلال بادام زمینی به کمک بینی الکترونیکی. مهندسی بیوسیستم ایران ۵۴ (۳): ۷۴-۶۱.
- عزت‌پور، ب.، بادپروا، ا.، احمدی، ش.، رشیدی‌پور، م. و ضیائی، ه. ۱۳۸۷. بررسی تأثیر اسانس گیاه اسطوخودوس بر تریکوموناس واژینالیز در محیط *In vitro*. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام ۱۶ (۴): ۳۷-۳۱.
- عطایی عظیمی، ع.، دنناز هاشملویان، ب. و غنایی، ع.م. ۱۳۸۵. اثر ضدقارچی عصاره‌های آب، الکلی و فنی دانه و برگ سورگوم بیکالر *Sorghum bicolor* L. Moench بر فوزاریوم سولانی و فوزاریوم پوآ. گیاهان دارویی ۳۶ (۳): ۳۲-۲۶.
- غلام‌نژاد، ج.، محمدی گل تپه، ا.، سنجریان، ف.، صفایی، ن. و رضوی، خ. ۱۳۹۲. بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر روی علائم بیماری سپتوریای برگ *Mycosphaella graminicola*. تحقیقات بیماری‌های گیاهی ۲۱ (۲): ۴۶-۳۵.
- غلامی، ع.، عربستانی، م. ر. و احمدی، م. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و آبی گیاه بن‌سرخ (*Allium Jesdianum*) بر روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا با مقاومت دارویی گسترده. مجله علمی پژوهان ۱۴ (۴): ۲۶-۱۸.
- کردجی، ع. و فرهمندفر، ر. ۱۳۹۸. فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی برگ کاردین بر لیستریا مونوسیتوزنز، سالمونلا اینترتیدیس و سودوموناس آئروژینوزا. علوم و صنایع غذایی ۹۷ (۱۶): ۳۵-۲۹. <http://dx.doi.org/10.29252/fsct.16.97.29>
- محمودی، ر.، زنگنه‌نژاد، ز. و سترکی، م. ۱۳۹۷. اثر حفاظتی عصاره گیاه کارده بر افسردگی و درد در مدل پارکینسون ایجاد شده توسط ۶-هیدروکسی دوپامین در موش‌های صحرایی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵ (۴): ۳۶۵-۳۷۱.
- معراجی، ه.، محمدی، م.، سالک سیفی، ک.، حزبئی‌پور، س. و مرادی، م. ۱۳۹۷. مهار دو گونه قارچ فوزاریوم توسط اسانس گیاهان دارویی. تحقیقات نوین در گیاه پزشکی ۱۱ (۱): ۵۸-۴۵.
- موسیوند، م.، رحیمیان، ح. و شمس‌بخش، م. ۱۳۸۸. ارتباط فنوتیپی و ژنتیکی سویه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* جدا شده از نیشکر، درختان میوه هسته‌دار و گندم. بیماری‌های گیاهی ۴۵ (۱): ۹۸-۸۵.
- وحدانی، ر.، محرابی سی‌سخت، ص.ا.، ملک‌زاده، ج.م.، جان‌نثار، ر.، صادقی، ه.ا. و شفایی‌پور، ا. ۱۳۹۰. تأثیر عصاره آبی بن‌سرخ بر پیشگیری از سنگ کلیه ناشی از اتیلن گلیکول در موش نر نژاد ویستار. ارمغان دانش ۱۶ (۶): ۵۶۶-۵۵۷.

Abdul-Aziz, H., Omran, A. and Zakaria, W.R. 2010. H₂O₂ oxidation of pre-coagulated semi aerobic leachate. International Journal of Environmental Research 4(2): 209-216.

- Abu-Lafi, S., Odeh, I., Dewik, H., Qabajah, M., Hanuš, L.O. and Dembitsky, V.M. 2008.** Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresource Technology* 99(9): 3914-3918. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.042>.
- Amiri, H. 2007.** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Allium jesdianum* Boiss. and Buhse from Iran. *Journal of Medicinal Plants* 6(1): 39-44. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.2717204.2007.6.21.6.7>.
- Atmani, F., Sadki, C., Aziz, M., Mimouni, M. and Hacht, B. 2009.** *Cynodon dactylon* extract as a preventive and curative agent in experimentally induced nephrolithiasis. *Urological Research* 37(2): 75-82. <https://doi.org/10.1007/s00240-009-0174-8>.
- Bachir, R.G., Boudali, T. and Hakem, O. 2020.** Antifungal activity of five commercial extract against *Alternaria alternata*. *Journal of Biotechnology Research* 6(8): 98-103. <https://doi.org/10.32861/jbr.68.98.103>.
- Bahraminejad, S., Asenstorfer, R.E., Riley, I.T. and Schultz, C.J. 2008.** Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots of oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Phytopathology* 156(1): 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01309.x>.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008.** Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2): 446- 475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- Bhat, R. 2021.** Bioactive Compounds of *Allium* Species. In: Murthy, H.N. and Paek, K.Y. (eds.). *Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57415-4_17.
- Cacique, I.S., Barbosa, E.S., de Pinho, G.P. and Silverio, F.O. 2020.** Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência e Agrotecnologia* 44: e017420. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044017420>.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. 2012.** The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research* 21: 501-506. <https://doi.org/10.1002/ptr.2124>.
- Čolić, S., Zec, G., Natić, M. and Fotirić-Akšić, M. 2019.** Almond (*Prunus dulcis*) oil. Pp. 149-180. In: Ramadan, M. (ed.). *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12473-1_6.
- De Araujo, G.G., Rodrigues, F., Gonçalves, F.L.T. and Galante, D. 2019.** Survival and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* strains exposed to simulated high-altitude atmospheric conditions. *Scientific Reports* 9(1): 7768. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44283-3>.
- Dulla, G.F., Krasileva, K.V. and Lindow, S.E. 2010.** Interference of quorum sensing in *Pseudomonas syringae* by bacterial epiphytes that limit iron availability. *Environmental Microbiology* 12(6): 1762-1774. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02261.x>.
- Gholamnezhad, J. 2019.** Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Integrative Agriculture* 18(1): 115-123. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62104-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62104-5).
- Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi Goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi, Kh. 2016.** Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with *Mycosphaerella graminicola*. *Scientia Agriculturae Bohemica* 47: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1515/sab-2016-0001>.
- Ivanović, Ž., Stanković, S., Živković, S., Gavrilović, V., Kojić, M. and Fira, D. 2012.** Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 134: 191-203.
- Lopez, M.M., Llop, P., Olmos, A., Mcro-Noales, E., Cambra, M. and Bertolini, E. 2009.** Are the molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses. *Current Issues in Molecular Biology* 11: 13-46.
- Mohsenzadeh, S. 2024.** A Short Review of *Allium jesdianum* Boiss. and Buhse (Amaryllidaceae). *Herbal Medicines Journal* (in press).
- Naeini, A., Yaraee, R. and Shokri, H. 2020.** Antifungal and immunomodulatory activity of *Allium jesdianum* Boiss extracts. *Journal of Herbmmed Pharmacology* 9(1): 75-80.
- Prusinowska, R. and Śmigielski, K.B. 2014.** Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. *Herba Polonica* 60(2): 56-66.
- Radjabian, T., Hosseinpour Yektaei, Z., Naghizadeh, M.M. and Ghazanfari, T. 2022.** Immunomodulatory impacts of bulbs extracts from five *Allium* species on IFN- γ , IL-4, and IL-11. *Cytokines and Immunoregulation* 4(2): 91-100.

- Rahimi, S. and Madani, M. 2015.** Evaluation of different concentrations of ethanolic extract of *Allium jesdianum* on humoral immunity in infected mice with *Candida albicans*. Journal of Medicinal Plants 4(1): 23-29.
- Samavatian, H. 2006.** Identification and distribution of bacterial disease agent of almond tree canker in Isfahan province. Acta Horticulturae 726: 667–671.
- Schwartz, E., Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ya'akov, I., Wiesman, Z., Tripler, E., Bar-Ilan, I., Fromm, H., Borochoy-Neori, H., Holland, D. and Amir, R.J. 2009.** Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(19): 9197-9209.
- Shariatifar, N., Shoeibi, S., Sani, M.J., Jamshidi, A.H., Zarei, A., Mehdizade, A. and Dadgarnejad, M. 2014.** Study on diuretic activity of saffron (stigma of *Crocus sativus* L.) aqueous extract in rat. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research 5: 17-20. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.126982>.
- Shila, S.J., Islam, M.R., Ahmed, N.N., Dastogeer, K.M.G. and Meah, M.B. 2013.** Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* associated with the seeds of cucurbits. Universal Journal of Agricultural Research 1(1): 1-8. <http://dx.doi.org/10.13189/ujar.2013.010101>.
- Sodaieizadeh, H., Rafieiolhossaini, M. and Van-Damme, P. 2010.** Herbicidal activity of a medicinal plant, *Peganum harmala* L. and decomposition dynamics of its phytotoxins in the soil. Industrial Crops and Products 31(2): 385-394. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.12.006>.
- Sowndhararajan, K., Joseph, J.M. and Manian, S. 2013.** Antioxidant and free radical scavenging activities of Indian Acacias, *Acacia leucophloea* (Roxb) Willd., *Acacia ferruginea* DC., *Acacia dealbata* Link. and *Acacia pennata* L. Willd. International Journal of Food Properties 16(8): 1717-1729. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.604895>.
- Soylu, S., Yigitbas, H., Soyulu, E.M. and Kurt, S. 2007.** Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology 103: 1021-1030. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03310.x>.
- Tabatabaei-Yazdi, F., Alizadeh-Behbahani, B., Vasiee, A.R., Mortazavi, S.A. and Tabatabaei-Yazdi, F. 2016.** Antifungal activity of extracts *Biarum carduchorum* (Kardeh) on *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium expansum* in vitro. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 18(4): e6464. <https://doi.org/10.17795/zjrms-6464>.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M.A., Prabhakar, A. and Rather, M.A. 2019.** A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microbial Pathogenesis 134: 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>.
- Tribelli, P.M., Lujan, A.M., Pardo, A., Ibarra, J.G., Fernandez Do Porto, D., Smania, A. and López, N.I. 2019.** Core regulon of the global anaerobic regulator Anr targets central metabolism functions in *Pseudomonas* species. Scientific Reports 9(1): 9065. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45541-0>.
- Vakili, S., Shabaninejad, Z., Ameri, M., Ebrahiminezhad, A., Shojazadeh, A., Safarpour, H., Khalaf, N. and Noorozi, S. 2022.** Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles by *Biarum chaduchrum* leaf extract. Applied Physiology 128: 241. <https://doi.org/10.1007/s00339-022-05384-5>.
- Wahab, B.A.A., Alamri, Z.Z., Jabbar, A.A., Ibrahim, A.A.I., Almailmani, R.A., Almasmoum, H.A., Ghaith, M.M., Farrash, W.F., Almutawif, Y.A., Ageeli, K.A., Alfaifi, S.M. and Alharthi, R.F. 2023.** Phytochemistry, antioxidant, anticancer, and acute toxicity of traditional medicinal food *Biarum bovei* (Kardeh). BMC Complementary Medicine and Therapies 23 (1): 283. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04080-y>.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M.J. and Salgueiro, L. 2018.** Antifungal activity of lavender essential oil against *Botrytis cinerea*. Industrial Crops and Products 124: 331-337. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.032>.

The effect of plant extracts on reducing the growth of almond bacterial canker agent (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) in vitro conditions

M.R. Arzhang¹, J. Gholamnezhad^{2*}, A. Jafari², H. Meftahizadeh² and M. Barhamat³

Received: 1 Jul., 2024

Accepted: 9 Sep., 2024

ABSTRACT

Almond is native to Central Asia and Iran and one of the most important garden crops in the country and has an important place among the garden crops in the country, especially in the western part of the country. Bacterial canker disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is also known as bud blast disease and blossom blast disease. Given the importance of this disease and the need to fight it correctly and systematically, the present study was conducted with the aim of investigating the effect of plant extracts including Lavender, Biarum and Michael Hoog on reducing the pathogenicity of the bacteria *P. syringae* pv. *syringae* and introducing an effective and practical concentration of plant extracts in a laboratory test. The test was performed on Nutrient Agar culture medium and after the bacteria were cultivated, wells with a diameter of three millimeters were created in the middle of each Petri dish on the culture medium and about 10 microliters of each extract were poured into each well. Sterile distilled water was used as the control. Three replicates were considered for each extract. The concentrations of aqueous and alcoholic extracts were 500, 1500 and 2000ppm. After 48 hours of pouring the extracts into the wells, the growth inhibitory area around the well was measured, and finally the percentage of control of each extract compared to the distilled water control was calculated. The results show that the best inhibitory effect among the aqueous extracts was related to the aqueous extract of Lavender with a concentration of 2000ppm with an inhibitory effect of 82.45%, and the aqueous extract of Michael Hoog with a concentration of 500ppm with an inhibitory effect of 29.68% had the least inhibitory effect on the bacteria *P. syringae* pv. *syringae* in vitro condition; The best inhibitory effect among alcoholic extracts was related to the ethanol extract of Lavender with a concentration of 2000ppm with an inhibitory effect of 84.12%, and the ethanol extract of Michael Hoog with a concentration of 500ppm with an inhibitory effect of 34.12% had the lowest inhibitory effect on the *P. syringae* pv. *syringae* in vitro conditions; all treatments used in this study were statistically better than the control treatment. The findings in this study showed that the plant extracts used in this study have inhibitory properties against the bacteria that cause bacterial canker in laboratory conditions, so by finding formulations of plant compounds such as extracts, they can be used as substitutes for chemical compounds that have less herbicidal properties, fewer environmental risks, and guarantee human and environmental health against these bacteria.

Key words: Bacterial canker, Almonds, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Plant extracts

-
1. MSc. Student, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
 2. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
 3. MSc. student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Corresponding author: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir