مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره اول (پیاپی ۳۰) بهار ۱۳۹۶
صفحات ۷۹-۶۹

Original Article

بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس مرزنجوش بر باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات

مریم شاهی‌وند*[۱]، مجتبی رضایی احمدآبادی[۲]، عیدی بازگیر[۳]، رستم یزدانی بیوکی[۴]

[۱] کارشناس ارشد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، [۲] مربی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، [۳] استادیار، گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، [۴] استادیار، مرکز ملی تحقیقات شوری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یزد.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری شانکر باکتریایی مرکبات یکی از مهمترین بیماری‌های مرکبات است که توسط باکتری *زانتوموناس سیتری* زیر گونه *سیتری* ایجاد می گردد. این بیماری در بسیاری از مناطق مرکبات خیز ایران مشاهده شده است. با توجه به خسارت زیاد این بیماری، کنترل آن ضروری می‌باشد. یکی از روش‌های نوین در کنترل بیماری، استفاده از اسانس‌هاس گیاهی است. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر اسانس گیاهی مرزنجوش بر روی فعالیت عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی عامل بیماری از باغات مرکبات آلوده شهرستان پلدختر جداسازی و توسط آزمون های فنوتیپی، بیوشیمیایی و استفاده از آغازگرهای اختصاصی شناسایی شد. اسانس نمونه با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید. اثر ضد باکتریایی اسانس با روش نشت در دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس تعیین گردید. سپس اثر غلظت های مختلف اسانس مرزنجوش به روش برگ بریده مورد بررسی قرار گرفت. اسانس مرزنجوش پس از آماده سازی، به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (GC/MS) تزریق و نوع ترکیبات آن مشخص شد.

یافته‌ها: حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس به ترتیب ۳/۵ و ٤ میکرولیتر بر میلی لیتر بود. موثرترین غلظت‌ها برای کاهش بیماری در روش برگ بریده غلظت‌های ٤ و ٤/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر بود، که میزان بیماری را در روش آب-آگار به ترتیب به میزان ٦۲/۵ و ۵۳/۱۲ درصد و در روش سینی به ترتیب ٦۲/۵ و ۵۳/۱۲ درصد کاهش داد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می توان اسانس مرزنجوش را به عنوان یک ترکیب بالقوه برای کنترل بیماری شانکر مرکبات معرفی نمود.

واژگان کلیدی: ضد میکروبی، گیاهان دارویی، مقادیر بازدارندگی و کشندگی.

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۵

مقدمه

مرکبات به خانواده *روتاسه* (*Rutaceae*) تعلق دارند که در مناطق مختلف کشور از جمله سواحل دریایی خزر، قسمت های مرکزی (استان های سیستان و بلوچستان، ایلام، فارس، کرمان) و سواحل خلیج فارس کشت می‌گردند (۱). یکی از عوامل محدود کننده کشت مرکبات، شانکر باکتریایی مرکبات می‌باشد. عامل آن باکتری *زانتوموناس سیتری* زیر گونه سیتری (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) گزارش شده است (۲). این بیماری به دلیل داشتن بیش‌ترین میزان طغیان در مناطق مرکبات خیز دنیا، از خطرناک ترین بیماری‌های مرکبات محسوب می‌گردد (۳). آلودگی مرکبات به این نوع شانکر به وسیله لکه‌های چوب پنبه ای با هاله آبسوخته و زرد ظاهر می شود (٤) و سبب ریزش برگ، آسیب شدید به میوه، ریزش میوه‌های نارس، مرگ سرشاخه‌های جوان و زوال درخت می گردد (۵). از آن‌جایی که انتشار و گسترش این بیماری در صورت مساعد بودن شرایط آب و هوایی و رطوبت بالا بسیار

*) آدرس برای مکاتبه: لرستان، دانشگاه لرستان، گروه گیاه پزشکی.
تلفن: ۰۹۱٦٦۹۸۰۰۸۳ پست الکترونیک: maryam.0083@yahoo.com

سریع می‌باشد (٦)، می‌بایست اقدامات مؤثری در راستای کنترل این بیماری انجام شود.

روش های مورد استفاده برای کنترل این بیماری شامل استفاده از ارقام مقاوم، استفاده از بادشکن برای جلوگیری از پخش مایه تلقیح و برنامه های کاربردی برای استفاده به موقع از باکتری کش‌های مسی است. از آنجایی که مقاومت باکتری نسبت به این سموم مسی در حال افزایش است، بنابراین میزان مصرف سموم سمی افزایش می یابد. به علاوه نگرانی فزآینده در مورد تجمع این مواد در فرآورده های غذایی و محیط نیز وجود دارد (۷).

ترکیبات عصاره‌های به دست آمده از گیاهان دارویی دارای خواص میکروبی بوده و به عنوان مواد ضد میکروبی در مقابل عوامل بیماری زا عمل می‌کنند. این گیاهان اثرات بازدارندگی در مقابل باکتری‌های بیماری زا نشان می‌دهند (۸). همچنین می‌توان از خاصیت ضدباکتریایی عصاره ها و اسانس های گیاهی به عنوان جایگزینی برای سموم شیمیایی و آنتی بیوتیک ها استفاده نمود. تاکنون گزارشات اندکی در مورد تأثیر اسانس ها در مدیریت شانکر مرکبات ثبت شده است.

مرزنجوش از خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) و بومی ایران می‌باشد. این گیاه علاوه بر استفاده در طب سنتی به عنوان داروی مسکن، مدر، معرق و ضد عفونی کننده در درمان بیماری های معده و روده و همچنین بیوست کاربرد فراوانی دارد. گونه‌های جنس مرزنجوش به طور گسترده‌ای در صنعت ادویه مورد استفاده قرار می‌گیرند (۹).

تاکنون کارآیی ضد باکتریایی عصاره‌های به دست آمده از ریشه، بذر، برگ‌های تازه و خشک گیاه علفی *هیدنوکارپوس انتیلمینتیکا* (*Hydnocarpus anthelmintica*) در شرایط آزمایشگاهی (۱۰)، عصاره‌های پنج گیاه انار (*Punica granatum*)، گواوا (*Psidium guajava*)، چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*)، تمر هندی (*Tamarindus indica*) و *اسپاندیاس پیناتا* (*Spondias pinnata*) به منظور کنترل شانکر باکتریایی مرکبات در سطح گلخانه و مزرعه مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۱).

با توجه به اهمیت این بیمارگر در ایران و وجود منابع بالقوه ضد میکروبی از گیاهان دارویی در ایران، هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس مرزنجوش بر عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی باکتری: در بازدیدهای انجام شده از مرکبات باغات شهرستان پل دختر استان لرستان، نمونه‌های مشکوک به شانکر باکتریایی مرکبات مشاهده گردید. به منظور جداسازی و شناسایی عامل بیمارگر، نمونه‌های برگ آلوده به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس پنج سویه عامل بیماری شانکر از برگ لیمو در شهرستان پلدختر جداسازی و خالص سازی گردید. همچنین آزمون‌های تشخیصی فنوتیپی، بیوشیمیایی و اثبات بیماری‌زایی بر روی آنها انجام شد (۱۲).

ب) تشخیص عامل بیماری با آغازگرهای اختصاصی: استخراج DNA از سویه های باکتریایی با روش جوشاندن به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید (۱۳). به منظور تکثیر ژن های مورد بررسی از پرایمرهای *Xac*1: 5′-CGCCATCCCCACCACCACCACGAC-3′ و *Xac2:* 5′-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3′ استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم و ۳ میکرلیتر DNA الگوی باکتریایی انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (آلمان) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳٦ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱٤). در ادامه محصولات PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شدند و با استفاده از دستگاه Gel documentation از آن ها

عکس برداری گردید.

ج) استخراج اسانس: اسانس های برگ، ساقه و گل مرزنجوش وحشی (*Origanum vulgare*) با استفاده از دستگاه کلونجر از ٤٠ گرم پیکر رویشی خشک شده به روش تقطیر با بخارآب به مدت ۳ ساعت استخراج شدند. سپس نمونه اسانس‌های به‌دست‌آمده جدا و وزن آن‌ها اندازه‌گیری گردید. پس از آب‌گیری توسط سولفات سدیم خشک، اسانس ها در ظروف شیشه‌ای تیره و در دمای یخچال (٤ °C) نگهداری شدند (۱۵).

د) بررسی ترکیبات اسانس: اسانس مرزنجوش پس از آماده سازی، به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (GC/MS) تزریق شد تا نوع ترکیبات آن مشخص شود. گاز کروماتوگراف واریان ۳٤۰۰ متصل به طیف‌سنجی جرمی با ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر که ضخامت لایه فاز ساکن در آن ۰/۲۵ میکرون است، مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌ریزی حرارتی از ٦۰ تا ۲۷۰ درجه سلیسیوس با افزایش دمای ۳ درجه در دقیقه، درجه حرارت محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سلیسیوس و درجه حرارت ترانسفرلاین ۲۹۰ درجه سلیسیوس تنظیم گردید. گاز هلیم با خلوص ۰/۹۹۹ به‌عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت. زمان اسکن برابر با یک ثانیه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و محدوده جرمی از ٤٦۰-٤۰ بود (١٦).

پس از خشک شدن نمونه‌ها، میزان ۵۰ گرم از پیکره رویشی همراه با گل به روش تقطیر با آب، توسط دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس‌گیری شد. پس از اسانس گیری به منظور جذب آب در نمونه اسانس از سولفات سدیم استفاده گردید.

ه) بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس به روش دیسک کاغذی: برای این منظور ابتدا سوسپانسون 10^8 CFU باکتری تهیه و به صورت یکنواخت بر روی پتری‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) به صورت چمنی کشت داده شد. سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از اسانس بر روی دیسک‌های کاغذی ٦ میلی‌متری استریل قرار داده و تعداد سه دیسک روی تشتک پتری قرار داده شد. از دیسک‌های کاغذی بدون اسانس به عنوان شاهد استفاده گردید. پتری‌های حاوی محیط کشت به انکوباتور ۲۵ °C منتقل و پس از ٤۸ ساعت از نظر ایجاد هاله بازدارنده مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

و) تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC): به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی از روش بورت (Burt) استفاده شد. در این روش از غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤، ٤/۵، ۵، ۵/۵، ٦، ٦/۵، ۷، ۷/۵، ۸ میکرولیتر بر میلی لیتر اسانس داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری استفاده گردید. درون هر میکروتیوب ۱ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث ریخته شد و غلظت های یاد شده اسانس به آن اضافه شد. همچنین به منظور حل شدن کامل اسانس با محیط کشت از توئین ۲۰ استفاده شد. سپس به هر میکروتیوب ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^6 CFU باکتری اضافه و به مدت ۲٤ ساعت بر روی شیکر در دمای اتاق قرار داده شد. به ترتیب از میکروتیوب‌های حاوی اسانس، توئین و اسانس-توئین بدون باکتری و میکروتیوب‌های حاوی باکتری و باکتری-توئین به عنوان شاهد استفاده گردید. پس از ٢٤ ساعت نمونه‌ها برای تعیین حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸).

ز) بررسی اثر کنترل کنندگی اسانس مرزنجوش در آزمون برگ بریده: برگ‌های جوان جدا شده از نهال‌های لیمو موجود در گلخانه با آب جاری شسته و به مدت ۲ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (وایتکس) ۱ درصد ضدعفونی گردیدند. پس از ضدعفونی به منظور حذف وایتکس، برگ‌ها در آب مقطر سترون شسته شدند. این آزمون به دو روش در داخل تشتک‌های پتری حاوی آب-آگار و سینی انجام شد. برای این آزمون از غلظت دارای اثر باکتری کشی و سه غلظت بالاتر و پایین تر از آن استفاده شد. ابتدا برگ‌ها با غلظت های ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤، ٤/۵، ۵ و ۵/۵ میکرولیتر اسانس اسپری پاشی و داخل تشتک‌های پتری حاوی آب-آگار و سینی قرار گرفتند. سه ساعت بعد از اسپری پاشی، در هر برگ ٤ ناحیه و در هر ناحیه ۸ زخم با استفاده از سوزن استریل ایجاد گردید (۱۹).

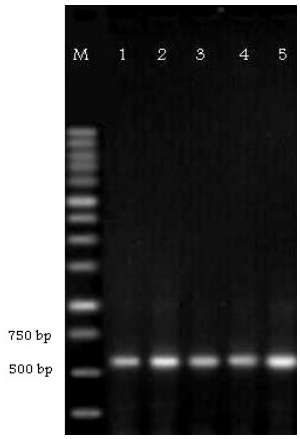
سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسون 10^6 CFU باکتری بر روی ناحیه سوزن زنی شده قرار داده شد. همچنین برگ‌های اسپری شده با اسانس و برگ‌های مایه زنی شده با سوسپانسیون بدون

حضور اسانس به عنوان شاهد استفاده شدند. تشتک‌های پتری و سینی حاوی برگ‌های مایه‌زنی شده در دمای ۲۸ °C درون انکوباتور نگهداری شدند. در نهایت پتری‌ها پس از دو هفته جهت بررسی علایم شانکر مورد بررسی قرار گرفتند (۲۰).

ح) آنالیز آماری: به منظور بررسی وجود اختلاف معنی دار در تعداد جوش حاصل از فعالیت باکتری و میزان غلظت، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سطح معنی دار بیش از ۵ درصد استفاده شد. برای تعیین میانگین و انحراف استاندارد حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) از آزمون پیرسون و سطح معنی دار بیش از ۱ درصد استفاده شد. تمامی تحلیل‌ها با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار *SPSS* انجام شد.

یافته ها

الف) شناسایی عامل بیماری: باکتری‌های جدا شده هوازی اجباری، گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و ایجاد کلنی‌های زرد روی محیط کشت YDC نمودند. باکتری قادر به هیدرولیز ژلاتین، نشاسته و اسکولین و رشد در نمک طعام ۱ و ۲ درصد بود. با استفاده از پرایمر اختصاصی شانکر باکتریایی مرکبات قطعه در محدوده ۵۸۱ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱). با توجه به آزمون‌های یاد شده و آزمون اثبات بیماری‌زایی، عامل بیماری *زانتوموناس سیتری* زیر گونه سیتری تشخیص داده شد.



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *Xac* در واکنش PCR. ستون های ۱ تا ۵) نمونه های مثبت باکتری *زانتوموناس سیتری* جدا شده از مرکبات آلوده.

ب) خاصیت ضد میکروبی: در این مطالعه تاثیر ضد باکتریایی اسانس به روش دیسک کاغذی مورد بررسی قرار گرفت. قطر هاله بازدارنده ۳/۵ سانتی‌متر بود که نشان دهنده اثر ضد باکتریایی قوی این اسانس است. همچنین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس، به ترتیب ۳/۵ و ٤ میکرولیتر بر میلی لیتر به دست آمد. در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی داری بین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی مشاهده گردید. رشد کلنی به میزان ٤٦ درصد نسبت به غلظت اسانس کمتر بود.

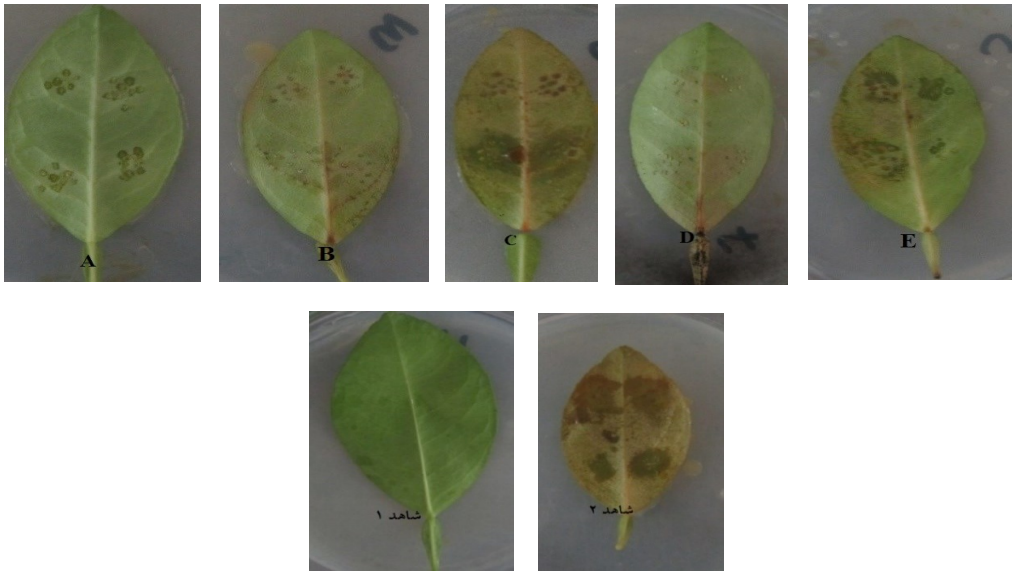
ج) اثبات بیماری زایی: در شرایط آزمایشگاه دو هفته پس از تلقیح باکتری علایم مورد بررسی قرار گرفت و تعداد لکه های ایجاد شده بر روی برگ‌ها (شکل های ۲ و ۳) در تمامی غلظت‌های اسانس شمارش شد (جدول ۱). نتایج نشان داد که در روش آب –آگار، در غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤ و ٤/۵، میزان جوش‌های حاصل از بیماری به ترتیب ۱۰۰، ۲۵/۸۱، ۱۲/۷۸، ۷۵، ٦۲/۵ و ۵۳/۱۲ درصد بود. در روش سینی در غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤ و ٤/۵ میزان جوش های حاصل

جدول ۱: تعداد جوش های ایجاد شده توسط باکتری روی برگ اسپری شده با غلظت‌های مختلف اسانس مرزنجوش به روش سینی و واتر آگار.

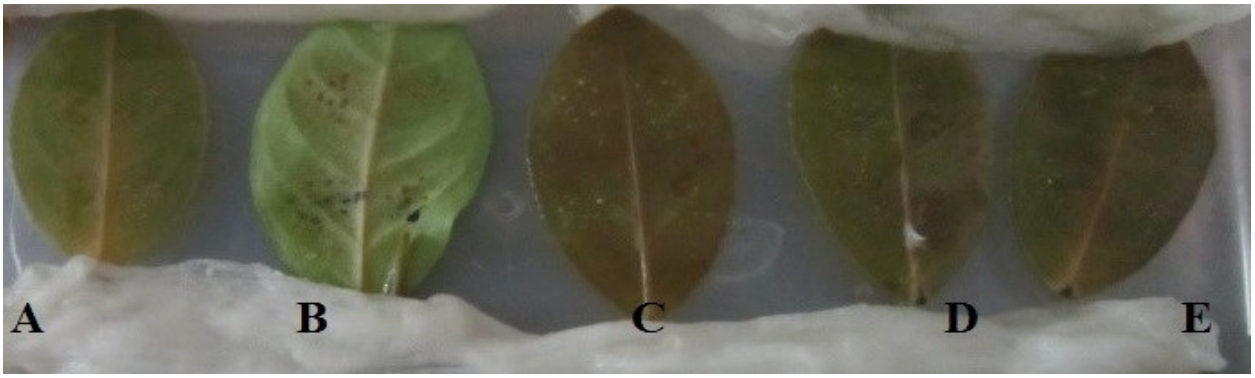
غلظت اسانس مرزنجوش	تعداد جوش در روش آب –آگار	تعداد جوش در روش سینی
غلظت ۴/۵	۱۷	۱٤
غلظت ۴	۲۰	۱۷
غلظت ۳/۵	۲٤	۲٤
غلظت ۳	۲۵	۳۱
غلظت ۲/۵	۲٦	۳۱
شاهد فقط باکتری	۳۲	۳۲
شاهد فقط اسانس	۰	۰

جدول ۲: آنالیز واریانس یک طرفه تعداد جوش حاصل از فعالیت باکتری و میزان غلظت در دو روش سینی و آب آگار.

غلظت (میکرولیتر بر میلی لیتر)	میانگین	انحراف معیار
غلظت ۰ تا ۲	۳۲	۰
غلظت ۲ تا ۵/۳	۲۸/۲۵	۳/۲۰
غلظت ۵/۳ تا ۵	۱٤/۵۰	۹/۹۵
کل	۲۰/۹۲	۱۰/٦۱



شکل ۲: اثر کنترل کنندگی اسانس مرزنجوش در آزمون برگ بریده به روش آب آگار. A) غلظت ۲/۵، B) غلظت ۳، C) غلظت ۳/۵، D) غلظت ٤، E) غلظت ٤/۵، شاهد ۱) کنترل فقط اسپری شده با اسانس و شاهد ۲) کنترل با تلقیح فقط باکتری.



شکل ۳: اثر کنترل کنندگی اسانس مرزنجوش در آزمون برگ بریده به روش سینی. A) غلظت ۲/۵، B) غلظت ۳، C) غلظت ۳/۵، D) غلظت ٤، E) غلظت ٤/۵.

از بیماری به ترتیب ۱۰۰، ۸۷/۹٦، ۸۷/۹٦، ۷۵، ٦۲/۵ و ۵۳/۱۲ درصد بود. جدول ۲ آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تعداد جوش حاصل از فعالیت باکتری و میزان غلظت، در دو روش سینی و آب آگار را نشان می دهد که در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی دار وجود نداشت. با افزایش غلظت از ۰ تا ۵ میانگین کاهش یافت. میزان کاهش غلظت در تیمار ۵-۳/۵ و ۳/۵-۲ نسبت به تیمار ۲-۰ به ترتیب برابر با ۵٤ و ۱۱ درصد بود.

د) تعیین ترکیبات اساس: ترکیب‌های موجود در اسانس مرزنجوش وحشی با استفاده از دستگاه GC-MS شناسایی‌شدند. بیشترین اجزای اسانس را ترکیبات تیمول، ٤-ترپینول، گاما-ترپنین، ترنس سابینن هیدرات، سابنین، آلفا-ترپینن، p- سیمن، ترنس کاریوفیلن و کارواکرول به ترتیب به میزان ۲۰/۹۷، ۱٦/۲۷، ۷/٦۲، ٦/۱۱، ٤/٤۹، ٤/٤۳، ٤/۲۷، ۳/۳٤ و ۳/۰۱ درصد تشکیل دادند (جدول ۳).

بحث

در مطالعه حاضر تاثیر اسانس گیاهی مرزنجوش بر روی فعالیت عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات مورد ارزیابی قرار گرفت. لکسومبون (Leksomboon) و همکاران در سال ۲۰۰۱

جدول ۳: ترکیب‌های شناسایی‌شده اسانس مرزنجوش وحشی با استفاده از دستگاه GC-MS.

نوع ترکیبات	درصد	شاخص بازداری	نوع ترکیبات	درصد	شاخص بازداری
α-Thujene	۲۳/۱	۹۲۶	-4Terpineol	۲۷۱۶/۲۷	۱۱۸۷
α-Pinene	۰/۷	۹۴۶	α-Terpineol	۲/۸۳	۱۱۹۶
Camphene	۰/۲	۹۵۸	cis-Piperitol	۰/۵۴	۱۱۹۷
Sabinene	۴/۹۴	۹۷۹	Piperitol<trans->	۰/۴۱	۱۲۱۱
β-Pinene	۰/۵۵	۹۸۲	Carvacrol, methyl ether	۱/۱۴	۱۲۴۴
Octanone<3->	۰/۷۴	۹۸۵	Bornyl acetate	۰/۲۵	۱۲۸۵
β-Myrcene	۱/۸۲	۹۹۱	Thymol	۲۰/۹۷	۱۳۰۰
-3Octanol	۰/۱۷	۹۹۴	Carvacrol	۳/۰۱	۱۳۰۶
α-Phellandrene	۰/۶۷	۱۰۰۵	trans-Caryophyllene	۳/۳۴	۱۴۱۷
Carene<delta-3->	۰/۰۸	۱۰۱۱	α-Humulene	۰/۳۱	۱۴۵۳
α-Terpinene	۴/۴۳	۱۰۲۳	Germacrene D	۰/۵۴	۱۴۸۲
p-Cymene	۴/۲۷	۱۰۳۲	Bicyclogermacrene	۰/۶۸	۱۴۹۸
Limonene	۲/۹	۱۰۳۵	β-Bisabolene	۰/۱۶	۱۵۰۴
β-(E)-Ocimene	۰/۰۸	۱۰۴۹	δ-Cadinene	۰/۰۸	۱۵۲۱
γ-Terpinene	۷/۶۲	۱۰۶۳	Elemol	۱/۱۵	۱۵۴۹
cis Sabinene hydrate	۲/۳۶	۱۰۷۰	Spathulenol	۰/۵۶	۱۵۸۲
α-Terpinolene	۲/۲۷	۱۰۹۰	Caryophyllene oxide	۰/۵	۱۵۷۱
trans Sabinene hydrate	۶/۱۱	۱۱۰۱	-10epi-γ-eudesmol	۰/۳	۱۶۳۶
-1octen-3-yl acetate	۰/۲۹	۱۱۰۹	Isospathulenol	۰/۱۶	۱۶۴۳
Menth-2-en-1-ol<cis-para->	۱/۸۷	۱۱۲۷	β-Eudesmol	۰/۴۸	۱۶۵۶
Menth-2-en-1-ol<trans-para>	۱/۲۳	۱۱۴۲	α-Eudesmol	۰/۵	۱۶۵۹
Borneol	۱/۳۹	۱۱۷۳	Intermedeol	۰/۳۵	۱۶۶۵

از گیاهان انار، گواوا، چای ترش، تمر هندی و *اسپوندیاس پیناتا* در آزمایشگاه و گلخانه علیه عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات استفاده نمودند. یافته های آنها نشان داد که از میان گیاهان مورد بررسی موثرترین اثر را تمر هندی داشته است. به طوری که میزان بیماری در آن ۴۸ درصد گزارش شد (۱۱).

در مطالعه سماوی (Samavi) و همکاران در سال ۲۰۰۹ از تیمارهایی با رقت 10^{-2} عصاره گیاهی آویشن، اکسی کلرورمس ۰/۳ درصد، مخلوط بردو ۱/۵ درصد، ترکیب مخلوط بردو ۱/۵ درصد + مانکوزب ۰/۴ درصد، ترکیب اکسی کلرورمس ۰/۳ درصد + مانکوزب ۰/۴ درصد و نانو سیلور (۲۰۰ppm و ۱۵۰، ۱۰۰) و ۱۰۰ ppm استرپتومایسین استفاده گردید. بهترین نتیجه از تیمارهای ترکیب مخلوط بردو ۱/۵ درصد+ مانکوزب ۰/۴ درصد و رقت 10^{-2} عصاره گیاهی آویشن به دست آمد. به طوری که در این تیمارها به ترتیب میزان بیماری ۷۸/۴۴ و ۷۸/۶۹ درصد کاهش یافت (۱۹). در مطالعه حاضر نیز کمترین میزان بیماری در غلظت ۴/۵ اسانس مشاهده شد و اثر بازدارندگی به ۵۳ درصد رسید. با توجه به کارهای مشابه اثر بازدارندگی قابل ملاحظه ای است.

بانی وانیچ (Boonywanich) و همکاران در سال ۱۹۹۸ در شرایط آزمایشگاهی اثر عصاره قسمت‌های مختلف گیاه علفی *هیدنوکارپوس آنتلمینتیکا* را بر روی باکتری‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که این عصاره قادر به کنترل رشد باکتری‌های مختلف می باشد. به طوری که عصاره دانه آن توانست رشد باکتری *زانتوموناس سیتری* را مهار نماید (۱۰). نتایج این تحقیق و آزمون‌های مشابه در زمینه کنترل عامل بیماری شانکر باکتریایی مرکبات تایید کننده تاثیر مثبت اسانس‌های گیاهی برای کنترل این بیماری می باشد.در این مطالعه غلظت‌های مختلف اسانس مرزنجوش سبب کاهش تعداد زخم‌های جوشی شکل ناشی از باکتری *زانتوموناس* گردید. تیمول، ۴-ترپینئول، آلفا-ترپینن، سابینن و ترانس سابینن

هیدرات بیش از ۷۰ درصد از ترکیبات اسانس را به خود اختصاص دادند.

آنالیز شیمیایی اسانس تیمبرا اسپیکاتا و بررسی خواص ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد مایکوباکتریومی اسانس تهیه شده از برگ های تازه گیاه نشان داده که اسانس گیاه حاوی ترکیبات مختلفی از جمله کارواکرول، P-سیمن، β-میرسن، γ-ترپینن، α-ترپینن، ترانس-کاریوپیلن می باشد. خواص ضد باکتریایی و ضد مایکوباکتریومی آن ها مشخص شده است (۲۰).

به طور کلی هر چه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی آنها علیه پاتوژن های غذایی بیشتر خواهد بود. این ترکیبات شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول می باشند. احتمالاً مکانیسم اثر این ترکیبات هم مانند سایر ترکیبات فنولی شامل اختلال در غشای سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی محرکه پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی می باشند (۱۸ و ۲۱).

تیمول و کارواکرول به عنوان اجزای اصلی اسانس مرزنجوش و آویشن و کارواکرول به عنوان جزء عمده در اسانس مرزه نقش مهمی در این اثربخشی دارد. به نظر می رسد که تیمول نسبت به کارواکرول نقش مهم تری در افزایش خاصیت ضد میکروبی ایفا می کند (۲۲). همچنین ثابت شده است که واکنش اجزای اسانس با یکدیگر نقش مهمی در تعیین اثر ضد میکروبی گیاه ایفا می کنند. تیمول و کارواکرول دارای اثرات هم افزایی نیز می باشند (۲۳).

اثر ضد باکتریایی آلفا ترپینن در مطالعه بورت (Burt) در سال ۲۰۰۴ مشخص شده است. به طوری که زمانی که p-سیمین با کارواکرول ترکیب شود می‌تواند به صورت سینرژیسم عمل نماید. با توجه به این مطالعات می‌توان گفت که خواص ضد میکروبی مرزنجوش به دلیل وجود ترکیباتی است که به طور عمده در اسانس مرزنجوش وجود دارد (۱۷). عوامل اقلیمی و محیطی تأثیر عمده ای در رشد و نمو و میزان مواد مؤثره گیاهان دارویی دارد (۲۴).

به طوری‌که در مطالعه‌ای که بر روی دو گونه گیاه مرزنجوش *Origanum majorana* L. و *Origanum vulgare* L. انجام شد آنالیز اسانس گیاهان نشان داد که میزان اسانس در گونه *O. vulgare* برابر ۰/۱۳ درصد در ماده خشک است و ترکیبات ترانس کاریوفیلن (۲۱/۴۶ درصد)، جرمان-D (۱۸/۹۹ درصد) و (*E, E-α*) فارنسن (۹/۱۲ درصد) به ترتیب بیشترین اجزای اسانس می باشند. همچنین در گونه *O. majorana* میزان اسانس برابر ۱/۰۹ درصد در ماده خشک بود و ترکیبات ترپینولن-۴-اُل (۲۳/۱۱ درصد)، γ-ترپینن (۱۳/۹۴ درصد) و α-ترپینین (۸/۱۱ درصد) به ترتیب بیشترین اجزای اسانس را تشکیل می دادند (۲۵).

با مطالعه جمعیت های مرزنجوش بستانی *O. majorana* رویش یافته در غرب ترکیه، سیس-سابنین هیدرات و ترپینن-۴-ال را به ترتیب به میزان ۳۰ تا ۴۴ درصد و ۸ تا ۱۴ درصد به عنوان ترکیبات اصلی اسانس این گیاه معرفی شدند. در حالی که باسر (Baser) و همکاران در سال ۱۹۹۳ میزان اثربخشی اسانس پیکر رویشی این گیاه را در نواحی جنوب غربی این کشور به مقادیر متنابهی از کارواکرول نسبت دادند (۲۶).

خانوی (Khanavi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ ترکیبات اصلی اسانس موجود در مرزنجوش بستانی کشت شده در نواحی گرگان را به صورت ترپینن-۴-ال (۳۶/۲)، پارا-سیمن (۱۶/۳ درصد) و گاما ترپنین (۷/۳۱ درصد) معرفی کردند. آنها سیس-سابینن هیدرات (۰/۳۶) را به عنوان یکی از ترکیبات فرعی اسانس گزارش نمودند (۲۷). براساس مطالعات انجام شده می‌توان این اثر بازدارندگی را به ترکیبات کارواکرول، تیمول و پارا-سیمین نسبت داد (۲۸). بر این اساس می توان امید داشت که در آینده بتوانیم شاهد به کارگیری اسانس‌ها و روغن‌های گیاهی به عنوان جایگزین ترکیبات شیمیایی باشیم.

نتیجه گیری

در شرایط آزمایشگاهی غلظت‌های مختلف اسانس مرزنجوش سبب کاهش تعداد زخم‌های جوشی شکل ناشی از باکتری *زانتوموناس* شده است. بیشترین تاثیر اسانس در کاهش تعداد زخم‌ها زمانی است که اسانس در غلظت ۴/۵ به کار رفته است. در این مطالعه با استفاده از دستگاه GC- MS مشخص

گردید که ترکیبات تیمول، ٤-ترپینول، گاما-ترپنین، ترنس سابینن هیدرات، سابنین، آلفا-ترپینن،p-سیمن، ترنس کاریوفیلن و کارواکرول بیشترین اجزای اسانس مرزنجوش وحشی را تشکیل می دهند. اثر ضد میکروبی بیشتر این ترکیبات به اثبات رسیده است. امید است که در آینده بتوان از ترکیبات و اسانس‌های گیاهی برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از گروه گیاه پزشکی دانشگاه لرستان و گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Farzad M. Growing and gardening of citrus, education and citrus fruits. Training and agricultural extension. Publisher; 2011. [In Persian]
2. Schaad NW, Ostnikova EP, Lacy G, Sechler A, Garkova L, Stromberg PE, Stromberg VK, Daver K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Syst Appl Microbiol. 2006; 29: 90-695.
3. Kumar N, Ebel RC, Roberts PD. Effect of salicylic acid on H2O2 metabolism during grapefruit (citrus paradise macaw.) *Xanthomonas citric* subs *citric* interaction. Agr Forestry. 2013; 59(3): 7-22.
4. Kumar N, Ebel RC, Roberts PD. Responses of *Citrus medica* var. sarcodactylis during *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Infection. Proc Fla State Hort Soc. 2012; 125: 108-111.
5. Khodakaramian G, Swings J. Genetic diversity and pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* strains inducing citrus canker disease in Iran and South Korea. Indian J Microbiol. 2011; 51(2): 194-199.
6. Khalaf AA, Gmitter FG, Conesa A, Dopazo J, Moore GA. *Fortunella margarita* transcriptional reprogramming triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. BMC Plant Biol. 2011; 11: 159.
7. Murate LS, Oliveira AG, Higashi1 AY, Barazetti AR, Simionato AS, Silva CS, Simões GC, Santos IMO, Ferreira MR, Cely MVT, Navarro MOP, Freitas VF, Nogueira MA, Mello JCP, Leite RP, Andrade G. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. Agric Sci. 2015; 6: 295-303.
8. Shahnia M, Khaksar R. Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2013; 7(5): 949-955.
9. Andi S, Nazeri V, Hadian J. A comparison of the essential oil chemical composition of *Origanum vulgare* L. sp. vulgare collected in its flowering and seed stages from Southern region of Chalus. Iran J Hortic Sci. 2012; 43(2): 153-159.
10. Boonywanich S, Panutat P. Studies on antibacterial potential of extracts from *Hydnocarpus anthelmintic* aagainst plant pathogenic bacteria. Science and technology publishing house. Thailand; 1998: 4.

11. Leksomboon CH, Thaveechai N, Kositratana W. Potential of plant extract for controlling citrus canker of lime. Kasetsart J Nat Sci. 2001; 32: 392-396.

12. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS, St, Paul, MN, USA; 2001: 373.

13. Ausubel F, Robert M, Kingston E, Moore D, Seidman JG. Short protocols in molecular biology, John Wiley publisher, London; 2004.

14. Coletta-Filho HD, Takita MA, Souza AA, Neto JR, Destefano SAL, Hartung JS, Machado MA. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. J Appl Microbiol, 2005; 100: 279-285.

15. British pharmacopoeia. British pharmacopoeia, London, HMSO; 1988.

16. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation; 2007.

17. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-253.

18. Alymanesh MR, Mirzaei H. 2013. Using some essential oils in the control of bacterial canker disease of stone fruit. Proceeding of the second National Congress on Medicinal Plants. 15-16 May, Tehran, Iran, 1135.

19. Samavi S, Hassanzadeh N, Faghihi MM, Rezaee Danesh Y. Effects of thyme (zaatar) essential oil and some chemical compounds in the control of citrus bacterial canker in Iran. J Plant Pathol. 2009; 91(3): 691-696.

20. Naturforsch Z. Analysis of essential oil composition of *Thymbra spicata* var. *spicata* antifungal. antibacterial and antimycobacterial Activities. Turgut Kılıc. 2006; 61: 324-328.

21. Tajkarim MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 2010; 21: 1199-2018.

22. Mahboubi M, Feizabadi M. The antimicrobial activity of thyme, sweet marjoram, savory and eucalyptus oils on *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. J Med Plants. 2009; 2(30): 137-144. [In Persian]

23. Sabzali S, Bakhtiyari S, Rostamzad A, Zamanian Azodi M. Comparison of antibacterial effect of *Thymbra spicata*'s essential oils with common therapeutic antibiotics. Res Med. 2013; 36 (5): 1-6.

24. Hosseni, R, Galesh, S, Soltani, A, Kalate, M, And Zahed, M, The effect of nitrogen fertilizer on indexes of nitrogen use efficiency in varieties of wheat, Iran J Field Crops Res, 2014, 11(2): 300 -306.[In Persian]

25. Tahmasebi S, Majd A, Mehrafarin A, Jonoubi P. Qualitative and Quantitative Assessment of the Essential Oils of *Origanum vulgare* and *Origanum majorana* in Iran. J Med Plants. 2014; 2 (50): 163-171. [In Persian]

26. Tabanca N, Ozek T, Baser K HC, Tumen G. Comparison of the essential oils of *Origanum*

majorana L. and Origanum x majoricum. Cambess.a. J Essent Oil Res. 2004; 4(3): 248-249.

27. Khanavi M, Norouzi M, Tabatabai H, SalehiNodeh A, BarzegarSafavi S, Shafiee, A. Identification of chemical composition of essential oils in multiflora (*Zataria multiflora* Boiss.) And oregano (*Origaunum majorana* L.) and evaluation of their antiviral effects. J Med Plants. 2010; 9(33): 128-137. [In Persian]

28. Safaeikhoram M, Jafarnia S, Khosrosheei S. The world's most important medicinal plants. Integrated Agricultural Education Sabziran; 2008. [In Persian]

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 1, April 2017

Original Article

Study on antibacterial effect of marjoram (*Origanum vulgare* L) essential oil on bacteria causing citrus canker

Maryam Shahivand[1], Mojtaba Rezaei Ahmadabadi[2], Eidi Bazgir[3], Rostam Yazdani Bioki[4]

[1]M.Sc., Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. [2]M.Sc., Faculty of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. [4]Assistant Professor, National Salinity Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Yazd, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Citrus bacterial canker (CBC) disease is one of the main citrus diseases that is caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. The disease has been reported from several citrus- growing regions of Iran. Due to the high loss incurred by the disease, its control is very much needed. One of the new methods to control the disease is the use of plant essential oils. This study was aimed to evaluate the effect of Marjoram essential oil on the activity of bacteria causing citrus canker.

Materials & Methods: In this experimental study, CBC- causing bacteria were isolated from infected Poldokhtar citrus gardens, and subsequently identified by phenotypic and biochemical tests, along with specific primers. The essential oil was extracted using a Clevenger extraction device. Antimicrobial effect of the essential oil was evaluated using disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oil were investigated, as well. Then, the effect of different concentrations of marigold essential oil was studied. Following Marjoram essential oil preparation, it was injected into a Gas-Chromatography Mass-Spectrometry (GC-MS) to determine the composition.

Results: MIC and MBC of essential oil were observed as 3.5 µl/ml, and 4 µl/ml, respectively. The most effective concentration for disease prevention on cut leaves were 4 µl/ml , and 4.5 µl/ml, which reduced disease incidence by 62.5% and 53.12 % on water agar test, and trays method.

Conclusion: It is concluded that marjoram essential oil can be used as a potential compound to control citrus bacterial canker disease.

Keywords: Antimicrobial, Medical plants, Inhibition and lethal doses.

Correspondence to: Maryam Shahivand

Tel: +98 9166980083

E-mail: maryam.0083@yahoo.com

Journal of Microbial World 2017, 10(1): 69-79.