مطالعه خاصیت ضد باکتریایی پنج گونه گلسنگ بومی منطقه ارسباران روی باکتری *Dikerya chrysanthemi* عامل پوسیدگی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه و انبار

سیده مریم شهیدی*[1]، سلیمان جمشیدی[2] و محمد ترابی[3]

چکیده

سیب‌زمینی از جمله گیاهانی است که سالیانه خسارت عمده‌ای بر اثر بیماری پوسیدگی غده ناشی از باکتری *Dikerya chrysanthemi* در انبار به آن وارد می‌شود. در این پژوهش به منظور استفاده از شیوه سازگار با طبیعت و کم خطر در مدیریت این بیماری گیاهی بر پایه خواص ضد میکروبی گلسنگ، پنج گونه گلسنگ شامل *Pleopsidium gobiensis*، *Ramalina sinensis*، *Parmelina tiliacea*، *Anaptychia setifera*، *Lecanora argopholis* از منطقه ارسباران جمع‌آوری شده و با سه نوع حلال متانول، دی اتیل اتر و استون عصاره گیری شد. اثر بازدارندگی این عصاره‌ها با روش‌های انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی در آزمایشگاه و نیز در انبار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره استونی *Pleospidium gobiensis* با ایجاد هاله 7/9 میلی‌متری و عصاره دی اتیل اتری گلسنگ *Parmelina tiliacea* با هاله 6/6 میلی‌متری، با حداقل غلظت بازدارنده و کشنده 0/54 و 1/09 میلی‌گرم بر میلی‌متر، مؤثرترین تیمارهای گلسنگی بودند و اثر آن‌ها حتی از شاهد استرپتومایسین بهتر بود. در مجموع، گلسنگ‌های *P. tiliacea* و *P. gobiensis* بیشترین اثر بازدارندگی را بر رشد باکتری مورد مطالعه در آزمایشگاه داشتند. بررسی انباری با آغشته کردن غده‌های سیب‌زمینی با عصاره‌های منتخب گلسنگ قبل یا بعد از مایه‌زنی با باکتری *D. chrysanthemi* نشان داد که تمامی تیمارها توانایی پیشگیری و معالجه کنندگی در برابر باکتری را داشتند و توانستند درصد قابل توجهی از سیب‌زمینی را از آسیب باکتری بیماری‌زا محافظت نمایند. عصاره استونی گلسنگ *R. sinensis* که بعد از مایه‌زنی باکتری *Dikerya chrysanthemi* به‌کار برده شد از بیشترین فعالیت بازدارندگی باکتری در شرایط انباری برخوردار بود، به طوری که 91 درصد غده‌های سیب‌زمینی را از آسیب باکتری محافظت نمود.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، عصاره گلسنگی، آنتی بیوتیک، پوسیدگی باکتریایی سیب‌زمینی.

تاریخ دریافت: 91/2/7 تاریخ پذیرش: 91/11/25

1- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا

2- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه

3- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا

*مسئول مکاتبات: **maryam_shahidy@yahoo.com**

مقدمه

باکتری *Dikerya chrysanthemi* عامل بیماری پوسیدگی غده سیب‌زمینی در انبار می‌باشد (Hooker, 1981; Azadvar *et al.,* 1386) به طوری که حدود 24 تا 38 درصد از ضایعات سیب‌زمینی طی سه ماهه اول انبارداری ناشی از این باکتری گزارش شده است (Varns *et al.*, 1985). استفاده از ترکیبات شیمیایی علاوه بر آلودگی‌های زیست محیطی، سلامت بشر را تهدید می‌کند که بر این اساس به کار بردن ترکیبات طبیعی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی، یکی از راهکارهای کاهش مخاطرات زیست محیطی است (Afzal *et al.*, 1997). گلسنگ‌ها اکوسیستم‌های کوچکی هستند که از دو موجود همزیست شامل بخش قارچی و بخش فتوسنتز کننده که اغلب شامل جلبک‌های سبز یا سیانوباکتری‌ها می‌باشند، تشکیل شده‌اند. گلسنگ‌ها از مهم‌ترین منابع منحصر به فرد شناخته‌شده‌ای هستند که دارای تولیدات طبیعی از گروه‌های مواد بیوشیمیایی مختلف مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها، ترکیبات فنلی و رنگدانه‌ها بوده و این تولیدات دارای خواص دارویی و ضد میکروبی هستند (Ahmadijanm *et al.,* 1973; Elix and Stocker-Worgotter, 2008). گلسنگ‌ها به خصوص بخش قارچی آن‌ها، قادرند انواع مختلفی از ترکیبات آلی و بیوشیمیایی را تولید نمایند. این ترکیبات غالباً ارزش چندانی در تأمین انرژی لازم برای بقا و ساخت اجزای سلولی گلسنگ‌ها ندارند و اغلب تولیدات ثانویه و حد واسطی هستند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم در متابولیسم سلول مؤثر هستند (Nash, 1996; Toms, 2008). ترکیبات متعدد آلی در گونه‌های مختلف گلسنگ‌ها وجود دارد که برای میکروارگانیسم‌های دیگر مثل باکتری‌ها و قارچ‌ها سمی بوده و سبب بازدارندگی رشد آن‌ها می‌گردند (Romagni *et al.*, 2004).

مطالعه روی مواد آنتی‌بیوتیک استخراج شده از گلسنگ‌ها توسط بورخولدر و همکاران (Burkholder *et al.*, 1994) آغاز شد. از آن زمان تا به امروز آنتی‌بیوتیک‌های بی‌نظیری از گلسنگ‌ها کشف شده که روی دامنه وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها مؤثر بوده‌اند (Ahmadijanm and Hale, 1973; Alexopoulos *et al.*, 1996; Burkholder *et al.*, 1944). این ترکیبات در هیف‌های کورتکس گلسنگ سایه پسند به عنوان محافظی مهم در برابر نور زیاد و اشعه ماورای بنفش به کار می‌رود و نیز خاصیت آنتی‌بیوتیک داشته و به حفاظت گلسنگ در مقابل حمله باکتری‌ها و یا قارچ‌ها کمک می‌کند که از این خاصیت در مقابل عوامل بیماری‌زا استفاده می‌گردد (Boustie and Grube, 2005; Tomas, 2008). براساس گزارش اسیمون و آدیکاو (Esimon and Adikwv, 1999) عصاره‌های اتیل الکل، کلروفرم، ان- هگزان گلسنگ *Ramalina farinocea* علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa* و قارچ‌های *Candida albicenc*، *Aspergillus niger*، *Trichophyton rubrum* و *Trichophyton mentagrophytes* دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند. هم‌چنین تای و همکاران (Tay *et al.*, 2004) گزارش کردند که عصاره استونی گلسنگ *Ramalina farinacea* و اوسنیک اسید[1] در مقابل هشت گونه باکتری و 17 گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی و انسانی دارای فعالیت بازدارندگی از رشد است. آن‌ها هم‌چنین گزارش کردند که اوسنیک اسید در مقابل باکتری *Yersinia enterocolitica* دارای خاصیت ضد باکتریایی است، ولی عصاره استونی این گلسنگ فاقد خاصیت ضد قارچی است. پائودل و همکاران (Paudel *et al.*, 2010) گزارش کردند که تمام ترکیبات استخراج شده از عصاره متانولی گلسنگ *Ramalina terbrata* از قبیل اوسنیک اسید، اوسمین[2] و رامالین[3]، در مقابل باکتری *B. subtilis* با حداقل غلظت بازدارنده 26 میلی‌گرم بر میلی-لیتر دارای خاصیت ضدباکتریایی بوده و عصاره خام و اوسنیک اسید در مقابل باکتری *Phylococcus aureus* خاصیت ضد باکتریایی داشته است. ساتی و جوشی (Sati and Joshi, 2011) با بررسی فعالیت ضد باکتری عصاره‌های متانولی، اتانولی، کلروفرمی و آبی گلسنگ *Parmotrema ailgherrense* در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و انسانی از جمله *B. subtilis*، *Erwinia chrysanthemi*، *E. coli*، *Agrobacterium tumefaciens* و *Xanthomonas phaseoli* گزارش کردند که تمام عصاره‌های گلسنگ مذکور در مقابل باکتری‌های مورد مطالعه دارای خاصیت ضد باکتری

[1] Usninic acid
[2] Osmin
[3] Ramalyn

می‌باشند. این تحقیق با هدف ارزیابی اثر بازدارندگی عصاره‌های مختلف پنج گونه گلسنگ بومی منطقه ارسباران (واقع در شمال غرب ایران) روی باکتری *Dikerya chrysanthemi* در شرایط آزمایشگاهی و انباری انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاهان و تهیه عصاره آن‌ها

نمونه‌های گلسنگی در اردیبهشت سال 1391 از منطقه ارسباران جمع‌آوری و به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه انتقال داده شد. مشخصات گلسنگ‌های جمع‌آوری شده در جدول 1 درج شده است. برای عصاره‌گیری، ابتدا گلسنگ‌ها چندین مرتبه با آب مقطر سترون داخل الک‌های معمولی شسته شده و به مدت 13 روز در تاریکی و شرایط معمول آزمایشگاهی قرار داده شدند تا به طور کامل رطوبت آن‌ها گرفته شد. سپس گلسنگ‌ها به قطعات کوچک خرد شده و با استفاده از آسیاب برقی (France Moulinex Co.) پودر شدند.

عصاره‌گیری با استفاده از سه حلال متانول، دی اتیل اتر و استون (Merck, Germany) انجام شد. برای این منظور از دستگاه سوکسله استفاده گردید. بدین صورت که 10 گرم از پودر گلسنگ داخل یک کاغذ صافی که به صورت مخروط درست شده بود ریخته شده و به داخل مخزن سوکسله انتقال داده شد و250 میلی‌لیتر از حلال مورد نظر در بالن ریخته شد که در اثر حرارت حلال بخار شده و روی نمونه ریخته شد. این عمل به مدت 5 ساعت ادامه یافت و عصاره‌های گلسنگ‌ها بدست آمد. برای جدا نمودن حلال از عصاره خشک، از دستگاه روتاری به همراه پمپ خلاء (Laboratoa 4010 Digital, Heidolph Co., Germany) استفاده شد. برای این منظور، عصاره داخل بالن خشک و سترون دستگاه روتاری ریخته و سپس در دمای 45 تا 50 درجه سلسیوس تحت خلاء قرار گرفت و عصاره غلیظ بدست آمد. ماده بدست آمده در دمای 4 درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد.

تهیه سوسپانسون باکتریایی

باکتری *Dikerya chrysanthemi* از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت شد و به محیط کشت آگار مغذی[1] منتقل شد. محیط‌های مایه‌زنی شده در دمای 28 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت نگهداری شد.

تهیه عصاره مایع از عصاره خشک و غلیظ شده گلسنگ

در آزمایشگاه، 35 میلی‌گرم از عصاره خشک و غلیظ شده گلسنگ در 1 میلی‌لیتر حلال خنثی دی متیل سولفوکسید[2] حل شده و با سرنگ فیلتر 0/22 میکرون سترون شد. به این ترتیب غلظت 35 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گلسنگ بدست آمد.

آزمون زیست سنجی

روش انتشار دیسک[3]

در تعیین فعالیت ضد باکتریایی در این تحقیق از روش (Modarresi Chahardehi *et al.*, 2010) استفاده شد. برای انجام آزمون ضد باکتریایی از محیط کشت مولر هینتون آگار[4] (Merck, Germany) به میزان 34 گرم در لیتر استفاده شد. مایه اولیه خالص‌سازی شد و یک تک کلون باکتری به وسیله سوزن سترون برداشته شده و در محلول سرم فیزیولوژی سترون حل شد. سوسپانسیون تهیه شده از باکتری با استاندارد نیم مک‌فارلند[5] مقایسه گردید تا از لحاظ میزان کدورت برابر باشند و بدین ترتیب سوسپانسیونی با رقت 10^7 – 10^9 سلول در میلی لیتر از باکتری بدست آمد. مقدار 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت ریخته شده و به وسیله پیپت پاستور سترون، به طور کامل روی محیط پخش شد و برای مدت 20 تا 25 دقیقه به منظور خشک شدن محیط بدون درب زیر هود قرار گرفت. سپس روی هر کدام از دیسک‌ها مقدار 15 میکرولیتر از عصاره‌های گلسنگ ریخته شد. آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و استرپتومایسین ساخت شرکت پادتن طب به عنوان شاهد مثبت و 15 میکرولیتر از حلال خنثی دی متیل سولفوکسید به‌عنوان شاهد منفی به دیسک‌ها اضافه شد. دیسک‌ها روی تشتک‌های پتری سترون به منظور خشک شدن کامل به مدت 10 دقیقه زیر هود قرار داده شد. سپس سه عدد دیسک شامل شاهد مثبت، منفی و عصاره در سه تکرار روی

[1] Firm Agar
[2] Dimethyl sulfoxide (DMSO)
[3] Disc diffusion
[4] Muller-Hinton agar
[5] McFarland standard

محیط کشت قرار داده شدند. تشتک‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس نگهداری شده و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. آزمون زیست سنجی با احتساب شاهدهای مثبت و شاهد منفی شامل 18 تیمار با سه تکرار در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با نرم‌افزار SPSS ver. 16 تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال 5٪ انجام شد.

روش رقت لوله‌ای و تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد[1] و کشنده[2] عصاره‌های گلسنگی

در آزمون حداقل غلظت بازدارنده رشد و کشنده از محیط کشت مولر هینتون براث[3] (21 گرم در لیتر) استفاده شد. برای تهیه غلظت اولیه عصاره گلسنگ از 70 میلی‌گرم عصاره خشک در 1 میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکسید استفاده شد. در این بخش از ده لوله آزمایش حاوی 1 میلی‌لیتر از محیط کشت استفاده شد. یکی از لوله‌های آزمایش به عنوان کنترل مثبت، فقط حاوی محیط کشت و باکتری و لوله آزمایش دیگر به عنوان کنترل منفی، فقط حاوی محیط کشت بود. هفت لوله آزمایش باقی مانده از شماره 1 تا 8 شماره‌گذاری گردید. در داخل لوله شماره 1، 1 میلی‌لیتر از عصاره گلسنگ با غلظت 70 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته شد، و سپس توسط شیکر محتویات لوله به مدت یک دقیقه یکنواخت شد. از لوله آزمایش شماره 1، مقدار 1 میلی‌لیتر از محلول هموژن به وسیله سمپلر برداشته شده و داخل لوله شماره 2 ریخته شد و این کار تا لوله شماره 8 تکرار شد و از لوله شماره 8، 1 میلی‌لیتر از محلول هموژن محیط کشت مایع و عصاره گلسنگ برداشته شد و به بیرون منتقل گردید. بدین ترتیب غلظت‌های 35، 17/5، 8/75، 4/37، 2/19، 1/09، 0/54، 0/27 میلی‌گرم در میلی-لیتر از عصاره‌های گلسنگی بدست آمد. سپس از سوسپانسیون باکتری تهیه شده مقدار 20 میکرولیتر برداشته شد و داخل تمام لوله‌ها به جز لوله کنترل منفی ریخته شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس نگهداری شده و سپس میزان رشد یا عدم رشد باکتری‌ها به‌صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. مرز رقت بدون هیچ رشد قابل رؤیت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده از رشد در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشنده، از محلول یکنواخت لوله‌های سری 10 میکرولیتر برداشته شده و به محیط کشت جامد مولر هینتون آگار انتقال داده شد و در دمای 37 درجه سلسیوس، به مدت 24 ساعت نگهداری شد. کمترین رقت که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد.

بررسی انباری

غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا با قطر غده متوسط 1 ± 5 سانتی‌متر و وزن بین 125-60 گرم از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اردبیل تهیه گردید.

سه ترکیب تیماری از عصاره‌های گلسنگی شامل عصاره متانول و استونی *R. sinensis* و عصاره استونی *P. gobiensis* که بیشترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشتند، انتخاب شدند.

باکتری مورد بررسی *Dikerya chrysanthemi* روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 30 درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌متر تهیه شد. از عصاره‌های خشک گلسنگ‌های مورد بررسی، غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر با استفاده از حلال دی متیل سولفوکسید تهیه شد. روی غده‌های سیب‌زمینی بعد از شستشو با آب مقطر و خشک و توزین و ثبت وزن اولیه آن‌ها، خراش‌هایی به‌عمق 5 میلی‌متر و طول 4 سانتی‌متر ایجاد شد. دو عدد غده سیب‌زمینی به عنوان یک کرت در ظرف درب‌دار یک بار مصرف شفاف به ابعاد 20×13×7 سانتی‌متر قرار گرفت. برای هر تیمار آزمایشی سه تکرار در نظر گرفته شد. تیمار غده‌ها با عصاره گلسنگ به دو صورت 30 ساعت قبل از مایه‌زنی با باکتری (به عنوان تیمار پیشگیری‌کننده) و 30 ساعت بعد از مایه‌زنی با باکتری (به عنوان تیمار معالجه‌کننده) انجام شد.

برای مایه‌زنی غده‌ها، سوسپانسیون باکتری در افشانه شیشه‌ای سترون ریخته شد و روی غده‌های سیب‌زمینی قرار داده شده در ظروف درب‌دار پاشیده شد، به نحوی که تمام سطح غده به آن آغشته شود. سپس غده‌ها به مدت 30 ساعت در حرارت 3 ± 38 درجه سلسیوس و رطوبت 10 ± 70٪ قرار گرفتند. نیمی از غده‌ها قبلاً به عصاره‌های گلسنگی با غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر آغشته شده بود. نیمی دیگر از

[1] Minimal inhibitory concentration (MIC)
[2] Minimal bactericide concentration (MBC)
[3] Muller-Hinton broth

غده‌ها، 30 ساعت بعد از مایه‌زنی باکتریایی با غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره گلسنگی تیمار شدند. برای مایه‌زنی غده‌ها، سوسپانسیون باکتری در افشانه شیشه‌ای سترون ریخته شد و روی غده‌های سیب‌زمینی پاشیده شد، به نحوی که تمام سطح غده به آن آغشته شود. سپس غده‌ها به مدت 30 ساعت در حرارت 3 ± 38 درجه سلسیوس و رطوبت 10 ± 70٪ قرار گرفتند. غده‌ها بعد از مایه‌زنی باکتریایی با غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره گلسنگی تیمار شدند. غده‌های سیب‌زمینی در همان شرایط نگهداری و به مدت هفت روز و با فاصله زمانی 24 ساعته از لحاظ وجود یا عدم وجود علایم یادداشت‌برداری شدند. در پایان هفت روز، غده‌های سیب‌زمینی پس از تخلیه بخش پوشیده و شستشوی آن با آب معمولی وزن شده و درصد باقی مانده سیب‌زمینی با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد باقی‌مانده سیب‌زمینی} = \frac{\text{وزن سیب‌زمینی پوسیده} \times ۱۰۰}{\text{وزن اولیه سیب‌زمینی}}$$

داده‌های حاصل در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به این منظور از نرم‌افزار SPSS ver. 16 استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر عصاره‌های مختلف گلسنگی بر باکتری *Dikerya chrysanthemi* به روش دیسک گذاری

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین عصاره‌های گلسنگی مورد بررسی روی ممانعت از رشد باکتری *Dikerya chrysanthemi* از نظر قطر هاله بازدارنده برحسب میلی‌متر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1٪ وجود داشت (جدول 2).

شاهد منفی حاوی حلال خنثی هیچ گونه هاله‌ای ایجاد نکرد و تأثیر بازدارنده‌ای بر رشد این باکتری نداشت. در شاهد مثبت تتراسایکلین هاله‌ای به قطر 23/4 میلی‌متری ایجاد شد که بیشترین هاله ایجاد شده در بین تیمارهای مورد مطالعه بود. با این حال، شاهد استرپتومایسین با ایجاد هاله 6/8 میلی‌متری، تأثیر بسیار کمتری نسبت به تتراسایکلین بر باکتری داشت. با توجه به این نکته که حلال‌های مختلف قادر به استخراج ترکیبات متفاوتی از گلسنگ‌ها هستند (Madamombe and Afolajan, 2003; Turk *et al*., 2003; Yilmaz *et al*., 2005; Rankovic *et al*., 2007; Rankovic *et al.*, 2010) اثر عصاره به دست آمده توسط حلال‌های مختلف متفاوت بود که این تفاوت دور از انتظار نبود (شکل 1). بر اساس گزارش‌های متعدد (Huneck, 1999; Aslan *et al*., 2001; Dulger *et al.*, 1997) گلسنگ‌ها و ترکیبات آن‌ها دارای چندین فعالیت بیولوژیکی از قبیل ضدویروسی، ضدباکتری، آنتی‌بیوتیکی، حساسیت‌زا و هم‌چنین دارای آنزیم‌های مهارکننده رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. در این پژوهش نیز عصاره‌های مختلف گلسنگ‌های مورد بررسی فعالیت ضد باکتریایی از خود نشان دادند. عصاره استونی *P. gobiensis* با ایجاد هاله 7/9 میلی‌متری و عصاره دی اتیل اتری گلسنگ *P. tiliacea* با هاله 6/6 میلی‌متری در یک سطح با آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین قرار داشته و این عصاره‌ها تأثیرگذارترین تیمارهای گلسنگی بر رشد باکتری مورد مطالعه بودند. با این حال، علیرغم این که این عصاره‌ها به‌طور معمول دارای ناخالصی‌ها و مواد همراه دیگری بودند، اما توانستند با آنتی بیوتیک خالص استرپتومایسین رقابت قابل توجهی داشته باشد. این امر نشان می‌دهد که در صورت استخراج و خالص‌سازی ماده یا مواد مؤثره این عصاره‌ها، احتمالاً بتوان اثرات بیشتری از این عصاره‌ها در مقایسه با تتراسایکلین انتظار داشت. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها از قبیل استرپتومایسین اثر کمی بر رشد باکتری‌های پوسیدگی سیب‌زمینی دارند (Farag *et al*., 1986). این نتایج با نتایج بدست آمده تحقیق حاضر نیز مشابه است که آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین تأثیر کمی در بازدارندگی از رشد باکتری مذکور داشت، ولی با این وجود برخی عصاره‌های گلسنگی مورد آزمایش تأثیر بهتری نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسن داشتند. این یافته بیانگر این می‌باشد که بعد از خالص‌سازی عصاره‌های گلسنگی و جداسازی و کشف ترکیبات مؤثر ضد باکتریایی آن‌ها، احتمالاً می‌توان آن‌ها را به‌عنوان تولیدات میکروبی با منشاء گیاهی، جایگزین آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین کرد. بعد از این عصاره‌ها طبق شکل‌های 1 و 2، عصاره دی اتیل اتری گلسنگ *A. ceteafera* و عصاره متانولی و استونی گلسنگ *R. sinensis* از لحاظ آماری در یک سطح قرار داشتند (شکل‌های 1 و 2). با این وجود، عصاره دی اتیل اتری *A. ceteafera* نسبت به سایر عصاره‌های همین گلسنگ توانایی بالایی در بازدارندگی از رشد باکتری داشت و این به دلیل توانایی بالقوه حلال دی اتیل اتر

در جداسازی ترکیبات ضدباکتریایی از این گلسنگ می‌باشد، به طوری که هاله بازدارنده عصاره متانولی این گلسنگ در یک سطح با شاهد منفی قرار داشت. با این حال در مورد گلسنگ *L. argopolice*، هر سه عصاره از لحاظ تأثیرگذاری روی باکتری با شاهد منفی در یک سطح قرار داشتند و بیانگر این است که هیچ‌کدام از این حلال‌ها توانایی جداسازی ترکیبات ضدباکتری از گلسنگ *L. argopolice* را دارا نبودند. عصاره استونی و متانولی گلسنگ *R. sinensis* تأثیر بیشتری در بازدارندگی از رشد باکتری نسبت به عصاره دیگر که در یک سطح با شاهد منفی بود، داشت.

حداقل غلظت بازدارنده رشد و غلظت کشنده عصاره‌های مختلف گلسنگی بر باکتری *Dikerya chrysanthemi*

عصاره استونی *P. gobiensis*، عصاره دی اتیل اتر *P. tiliace*، عصاره دی اتیل اتر *A. ceteafera* و عصاره استونی و متانولی *R. sinensis* با کمترین غلظت قادر به بازدارندگی و کشندگی باکتری *Dikerya chrysanthemi* بودند. عصاره دی اتیل اتر *P. tiliace* دارای حداقل غلظت بازدارنده و کشنده 0/54 و 1/09 میلی‌گرم بر میلی‌متر بود که با توجه به نسبت این دو، می‌توان گفت این عصاره بیشتر خاصیت کشندگی داشت تا بازدارندگی، زیرا باید غلظت بازدارنده را به 2 برابر افزایش دهیم تا خاصیت کشندگی داشتند، تمام عصاره‌های گلسنگ *R. sinensis* کشندگی دارند ولی تمام عصاره‌های گلسنگ *P. gobiensis* بیشتر بازدارنده بودند (**جدول 3**).

بررسی انباری

اعمال تیمار عصاره‌های گلسنگی بعد از مایه‌زنی باکتری *Dikerya chrysanthemi* در شرایط انباری

نتایج تجزیه واریانس آزمایشات در شرایط انباری نشان داد که با اعمال تیمار عصاره‌های گلسنگی بعد از مایه‌زنی باکتری *Dikerya chrysanthemi*، بین عصاره‌های گلسنگی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1٪ وجود داشت (جدول 4).

در تیمار شاهد شامل سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با باکتری بدون اعمال عصاره گلسنگی، 23/5 درصد از غده‌ها سالم بودند و در واقع بخش عمده‌ای از سیب‌زمینی در اثر مایه‌زنی با باکتری *Dikerya chrysanthemi* از بین رفته بود (76/5 درصد) و اختلاف آن با سایر تیمارهای گلسنگی اعمال شده معنی‌دار بود. به عبارت دیگر تمام تیمارها توانستند نسبت به شاهد درصد قابل توجهی از سیب‌زمینی را از آسیب باکتری محافظت نمایند (شکل 2). هفت روز بعد از اعمال عصاره گلسنگ‌های منتخب به عنوان ترکیب معالجه‌کننده، 91-80/5 درصد از غده‌های سیب‌زمینی سالم باقی ماندند. با این وجود اعمال عصاره استونی گلسنگ *P. gobiensis* روی سیب‌زمینی آلوده، باعث شد 80/5 درصد از غده‌ها سالم باقی بمانند که از لحاظ عددی در سطح پایین‌تری نسبت به سایر تیمارها قرار داشت. با توجه به نتایج بررسی خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های گلسنگی در شرایط انباری، می‌توان گفت عصاره‌های گلسنگی که در شرایط آزمایشگاهی دارای تأثیر بازدارندگی از رشد بیشتری بودند، در شرایط انباری نیز اثر بالقوه‌ای در معالجه‌کنندگی بیماری‌های باکتریایی مذکور داشتند.

اعمال تیمار عصاره‌های گلسنگی قبل از مایه‌زنی باکتری *Dikerya chrysanthemi* در شرایط انبار

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که با اعمال تیمار عصاره‌های گلسنگی مورد بررسی قبل از مایه‌زنی باکتری *Dikerya chrysanthemi*، از نظر درصد غده‌های سیب‌زمینی سالم، بین ترکیبات تیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1٪ وجود داشت (جدول 5).

در تیمار شاهد شامل سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با باکتری بدون اعمال عصاره گلسنگی، 23/5 درصد غده‌ها سالم بودند و در واقع بخش عمده‌ای از غده‌ها در اثر مایه‌زنی با باکتری *Dikerya chrysanthemi* از بین رفت و اختلاف آن با سایر تیمارهای گلسنگی اعمال شده معنی‌دار بود. به عبارت دیگر تمام تیمارها از لحاظ غده‌های سیب‌زمینی سالم در یک سطح آماری قرار داشته و توانستند نسبت به شاهد درصد قابل توجهی از غده‌های سیب‌زمینی را از آسیب باکتری محافظت نمایند.

با توجه به نتایج بررسی خاصیت ضد باکتری عصاره‌های گلسنگی در شرایط انباری، می‌توان گفت عصاره‌های گلسنگی که در شرایط آزمایشگاهی دارای بیشترین تأثیر از نظر بازدارندگی از رشد باکتری بودند، در شرایط انباری نیز اثر بالقوه‌ای در پیشگیری و معالجه کنندگی بیماری‌های باکتریایی مذکور داشتند. در مقابل، در تیمار شاهد که شامل سیب‌زمینی مایه‌زنی شده با باکتری، بدون اعمال عصاره گلسنگی بود،

بخش عمده‌ای از سیب‌زمینی در اثر مایه‌زنی با باکتری از بین نسبت به شاهد درصد قابل توجهی از غده‌های سیب‌زمینی را از آسیب باکتری محافظت نمایند و یا باعث معالجه بیماری پوسیدگی سیب‌زمینی شوند.

با شناسایی بیشتر گلسنگ‌های بومی شمال غرب ایران و سایر مناطق کشور و بررسی در جهت خالص‌سازی و شناسایی ترکیبات بیوشیمیایی عصاره گلسنگ‌ها در شرایط آزمایشگاهی رفت. این یافته نشان داد که تمام تیمارهای گلسنگی توانستند و انباری روی عوامل بیماری‌زای گیاهی اعم از عوامل قارچی و باکتریایی و هم‌چنین بررسی اثر خالص بخش قارچی گلسنگ‌ساز بدون جلبک با کشت و خالص‌سازی آن به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک می‌توان به دستاوردهای مثبتی در کنترل بیماری‌های گیاهی دست یافت.

جدول 1- مشخصات گلسنگ‌های جمع‌آوری شده و مشخصات مناطق جمع‌آوری آن‌ها

Table 1. Collected lichens geographic characteristics and their substrate

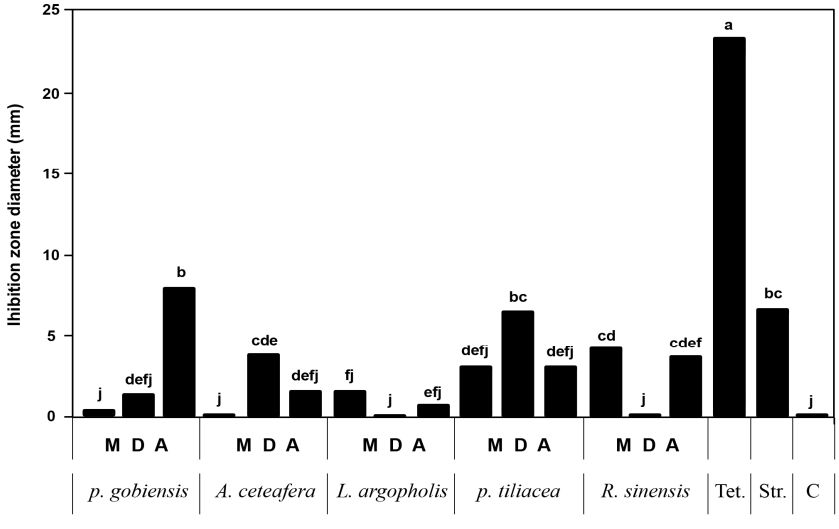
lichen	Collected site	substrate	altitude (m)	longitude	latitude
Parmelina tiliacea	Kolale	Rock	960	46° 61′ 15″ E	38° 88′ 77″ N
Ramalina sinensis	Kolale	Tree	1350	46° 61′ 15″ E	38° 87′ 05″ N
Anaptychia setifera	Kolale	Tree	1350	46° 61′ 15″ E	38° 87′ 05″ N
Lcanora argopholis	Kordasht	Rock	502	46° 36′ 75″ E	38° 90′ 88″ N
Pleopsidium gobiensis	Kordasht	Rock	502	46° 36′ 75″ E	38° 90′ 88″ N

جدول 2- تجزیه واریانس قطر هاله بازدارنده ایجاد شده توسط عصاره گلسنگ‌ها بر باکتری *Dikerya chrysanthemi*

Table 2. Variance analysis for growth inhibitior diameter on *Dikerya chrysanthemi* by lichens extract

S.O.V.	D.F.	Sum of squares	Mean of squares	F value	P value
treatment	17	1564.56	92.03**	30.57	<0.01
experimental error	36	108.42	3.01		
total	53	1672.93			

**Significant difference at 1% of probability level.



شکل 1- میزان هاله بازدارندگی عصاره‌های مختلف پنج گونه گلسنگ از باکتری *Dikerya chrysanthemi*

Figure 1. Inhibition zone of the various extracts of five lichens species against *Dikerya chrysanthemi*
M= Methanol, D= Diethil ether, A= Aceton, Tet.= Tetracycelin, Str.= Streptomycin, C= Control

جدول 3- مقدار حداقل غلظت بازدارنده از رشد، حداقل غلظت کشنده و نسبت غلظت کشنده بر بازدارنده عصاره‌های مختلف گلسنگی روی ***Dikerya chrysanthemi***

Table 3. The minimal inhibitive and bactericide concentrations (MIC and MBC) and MBC/MIC ratio of lichens extracts on *Dikerya chrysanthemi*

Lichen	Solvent	MIC Mg/ml	MBC Mg/ml	MBC/MIC
Pleopsidium gobiensis	Metanol	2.19	8.75	4
	Diethyl ether	2.19	8.75	4
	Acetone	1.09	8.75	8
Anaptychia setifera	Metanol	4.37	8.75	2
	Diethyl ether	1.09	8.75	8
	Acetone	4.37	17.5	4
Lcanora argopholis	Metanol	2.19	8.75	4
	Diethyl ether	4.37	17.5	4
	Acetone	4.37	8.75	2
Parmelina. tiliacea	Metanol	1.09	4.37	4
	Diethyl ether	0.54	1.09	2
	Acetone	1.09	8.75	8
Ramalina sinensis	Metanol	2.19	4.37	2
	Diethyl ether	8.75	17.5	2
	Acetone	1.09	2.19	2

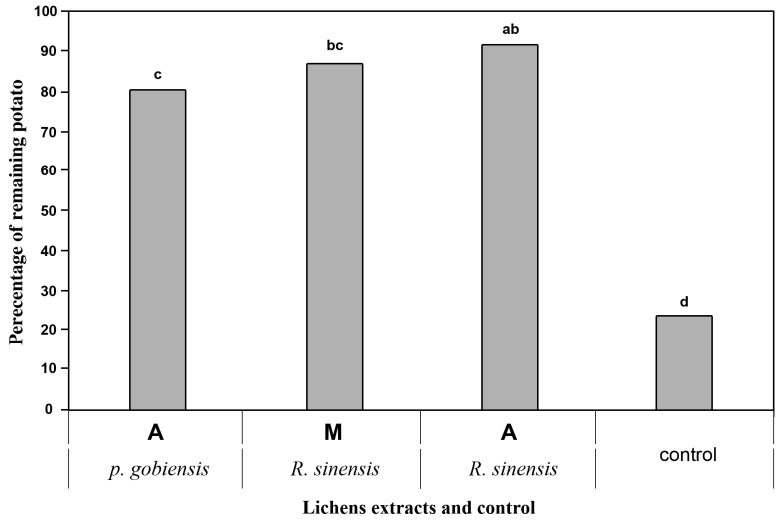
جدول 4- تجزیه واریانس درصد غده‌های سیب‌زمینی سالم تیمار شده با عصاره‌های گلسنگی بعد از مایه‌زنی باکتری ***Dikerya chrysanthemi*** در شرایط انباری

Table 4. Variance analysis for potato healthy tuber percentage treated with lichens extracts after inoculation with *Dikerya chrysanthemi*

S.O.V.	D.F.	Sum of squares	Mean of squares	F value	P value
treatment	3	8950.79	2983.59**	121.42	<0.01
experimental error	8	196.57	24.57		
total	11	9147.37			

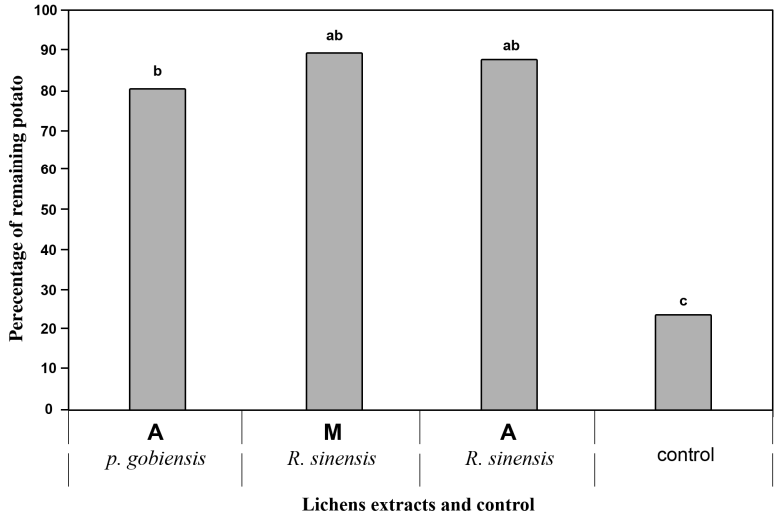
**Significant difference at 1% of probability level

**: معنی‌دار در سطح احتمال 1٪



شکل 2- درصد غده‌های سیب‌زمینی سالم در اثر اعمال عصاره‌های منتخب گلسنگی بعد از مایه‌زنی باکتری *Dikerya chrysanthemi*

Figure 2. Healthy part percentage of potato tubers with lichens extracts applying after inoculation by *Dikerya chrysanthemi*



شکل3- درصد غده‌های سیب‌زمینی سالم در اثر اعمال عصاره‌های منتخب گلسنگی قبل از مایه‌زنی باکتری *Dikerya chrysanthemi*

Figure 3. Healthy part percentage of potato tubers with lichens extracts applying before inoculation by *Dikerya chrysanthemi*

جدول5 - تجزیه واریانس درصد غده‌های سیب‌زمینی سالم در آزمایش تیمار عصاره‌های گلسنگی قبل از مایه‌زنی باکتری ***Dikerya chrysanthemi*** در شرایط انباری

Table 5. Variance analysis for potato healthy tuber percentage treated with lichens extracts before inoculation with *Dikerya chrysanthemi*

S.O.V.	D.F.	Sum of squares	Mean of squares	F value	P value
treatment	3	8808.31	2936.10**	37.21	0.01
experimental error	8	631.13	78.89		
total	11	9436.44			

**Significant difference at 1% of probability level

**: معنی‌دار در سطح احتمال 1٪

References

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.

Ahmadjianm V, Hale ME (1973) Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. The Lichens Academic Press, London 653–659.

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) Introductory on Mycology. 4th edn. John Wiley, New York 869 pp.

Aslan A, Gulluce M, Atalan E (2001) A study of antimicrobial activity of some lichens. Bulletin of pure and Applied Sciences 20: 23-26.

Aydin S, Kinaliogli K (2010) Antimicrobial activity of the lichen extracts of *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* and *P. tiliaceae*, The Black Sea Journal of Sciences Sonbahar 1(2): 30-38.

Azadvar M, Najafi-Nia M, Arshad J (1386) Evaluation of potato rot in stores and refrigeration. Jiroft, Research in Agriculture and Horticulture Development 75: 97-101.

Boustie J, Grube M (2005) Lichens'a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 3(2): 273-287.

Burkholder P, Evansa W, Mcveigh I, Thorntonh K (1944) Antibiotic activity of lichens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 30: 250–255.

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

Elix JA, Stocker-Wörgötter E (2008) Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash TH (Ed.), III: Lichen bology. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge UK,104-133.

Esimone CO, Adikwu MU (1999) Antimicrobial activity and cytotoxicity *Ramalina farinacea.* Journal Fitoterapia 70: 428-431.

Farag NS, Fawzi FG, El-Said SIA, Mikhail MS (1986) Streptomycin in relation to potato brown rot control. Acta Phytopathologica Entomologica Hungarica 21: 115-122.

Hooker WJ (1981) Compendium of potato disease. APS Press, Minnesota 125 pp.

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

Madamombe IT, Afolajan AJ (2003) Evaluation of antimicrobial activity of extracts from South African *Usnea barbata*. Pharmaceutical Biology 41: 199-202.

Modarresi Chahardehi A, Ibrahim D and Fariza Sulaiman S (2010) Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of Pilea microphylla, International Journal of Microbiology 826-830.

Nash TH (1996) Lichen biology. Combrige University Press, Combrige, UK, 303 pp.

Paudel B, Bhattarai HD, Lee HK, Oh H, Shin HW, Yim JH (2010) Antibacterial activities of ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarcitic lichen *Ramalina terbrata*. Zeitschrift für Naturforschung 65(1-2): 34-38.

Ranković B, Mišić M, Sdolak S, Milosavljevic D (2007) Antimicrobial activity of the lichens *Aspicilia cinerea*, *Collema cristatum*, *Ochrolechia androgyna, Physicia aipolia* and *Physcia caesia*. Italian Journal of Food Science 19(4): 461-469.

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

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, Boca Raton, Florida, pp. 13-33.

Sati SC, Joshi S (2011) Antibacterial activity of the Himalayan lichen *Parmotrema nilgherrense* extracts. British Microbiology Research Journal 1(2): 26-32.

Tay T, Turk, AO, Yilmaz M, Turk H and Kivac M (2004) Evaluation of the Antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its usnic acid and protocetraric acid constituents. Zeitschrift für Naturforschung 59: 384-388.

Tomas HN (2008) Lichen biology. Arizona State University, USA, 498 pp.

Turk AO, Yilmaz M, Kivanc M, Turk H (2003) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeate* and its protolichesterinic acid constituent. Zeitschrift für Naturforschung 58: 850-854.

Varns JL, Schaper LA, Preston DA (1985) Potatoes losses during the first three months of storage for processing. American Potato Journal 62: 91-99.

Yilmaz M, Tay T, Kivanc M, Turk H, Turk AS (2005) The antibacterial activity of extracts of the lichen *Hypogymnia tubulisa* and its 3-hydroxyphysodic acid constituent. Zeitschrift für Naturforschung 60: 35-38.