دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال دوازدهم، جلد ۱، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 12(1), 2023

Research Article

The impact of two active ingredients of plant essential oils on the causative agent of apple and pear fire blight disease

Mahdi Akhlaghi[1], Mohammad Reza Alymanesh[2]✉, Abbas Rohani [3],
Ali Reza Barjasteh[1], Mohammad Abedini Esfahlani[4], Ahmad Dezianian[1]

1. Department of Plant Protection Researches, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province, AREEO, Shahrood, Iran., 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran., 3. Department of Biosystems Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran., 4. Department of Crop and Horticultural Science Researches, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province, AREEO, Shahrood, Iran.

Received: 10.20.2022 Accepted: 02.06.2023

Akhlaghi, M., Alymanesh, MR., Rohani, A., Barjasteh, A., and Abedini Esfahlani, M., Dezianian, A. (2023) The impact of two active ingredients of plant essential oils on the causative agent of apple and pear fire blight disease. *Plant Pathology Science,* 12(1), 53-63. Doi: 10.2982/PPS.12.1.53

Abstract

Introduction: *Erwinia amylovora*, the cause of apple and pear fire blight disease, is one of the main factors limiting the production of these fruits in the world. Since only a limited number of copper compounds have a protective effect in controlling this disease, increasing attention has been paid to investigating the effect of plant essential oils on this pathogen. **Materials and Methods:** The effect of different concentrations of carvacrol (the active ingredient of thyme, oregano, etc.) and trans-anethole (the active ingredient of fennel essential oil) on the growth of *E. amylovora* colony, was investigated in laboratory conditions, and their minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. The inhibitory effect of MIC of these substances alone and the mixture of one-half of their MIC and MBC concentrations was investigated by disc method on nutrient agar medium on the growth of *E. amylovora* colony. The effect of the three best mixing ratios of these materials on the fruit tissue of the pear Spadona variety was evaluated on the severity of fire blight disease. **Results:** Carvacrol and trans-anethole both had antibacterial effects against *E. amylovora*, but the effect of carvacrol was greater than the other. Mixing carvacrol with trans-anethole increased its effectiveness. Among the three mixing ratios, 47 µg/ml of carvacrol + 141 µg/ml of trans-anethole caused the greatest reduction in disease severity in pear fruit tissue. **Conclusion:** The use of a mixture of carvacrol and trans-anethole can be considered for the management of fire blight disease.

Key words: *Erwinia amylovora*, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration

✉ Corresponding author: m.alimanesh@ilam.ac.ir

مقاله پژوهشی

تاثیر دو ماده موثره اسانس‌های گیاهی بر عامل بیماری آتشک سیب و گلابی

مهدی اخلاقی[1]، محمد رضا عالی‌منش[2]✉، عباس روحانی[3]، علی‌رضا برجسته[1]،
محمد عابدینی اسفهلانی[4]، احمد دزیانیان[1]

۱. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران، ۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام ، ۳. بخش مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ۴. بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود.

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۸ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷

اخلاقی م، عالی‌منش م، روحانی ع، برجسته ع، عابدینی اسفهلانی م، دزیانیان ا (۱۴۰۱) تاثیر دو ماده موثره اسانس‌های گیاهی بر عامل بیماری آتشک سیب و گلابی. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۲(۱): ۵۳-۶۳. Doi: 10.2982/PPS.12.1.53

چکیده

مقدمه: باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک سیب و گلابی یکی از عوامل اصلی محدود کننده تولید این میوهها در دنیا است. از آنجایی که فقط تعداد محدودی ترکیب مسی در مهار این بیماری تاثیر محافظت کنندگی دارند، توجه روزافزونی به بررسی تاثیر اسانسهای گیاهی بر این بیمارگر شده است. **مواد و روش‌ها:** اثر غلظتهای مختلف کارواکرول(ماده موثره اسانس آویشن، پونه کوهی و..) و ترانس-آنتول (ماده موثره اسانس رازیانه) بر رشد کلنی *E. amylovora* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کُشندگی (MBC) آنها تعیین شد. اثر بازدارندگی MIC این مواد به تنهایی و مخلوط غلظت‌های یک-دوم MIC و MBC آنها با روش دیسک روی محیط آگار غذایی بر رشد کلنی *E. amylovora* بررسی شد. اثر سه نسبت اختلاطی برتر این مواد روی بافت میوه گلابی رقم اسپادونا، بر شدت بیماری آتشک مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته‌ها:** کارواکرول و ترانس-آنتول هردو اثر ضد باکتریایی علیه *E. amylovora* داشتند، ولی اثر کارواکرول بیشتر از دیگری بود. مخلوط کردن کارواکرول با ترانس-آنتول اثر آنرا افزایش داد. از بین سه نسبت اختلاطی ۴۷ میکروگرم/ میلی‌لیتر کارواکرول + ۱۴۱ میکروگرم / میلی‌لیتر ترانس-آنتول سبب ایجاد بیشترین کاهش شدت بیماری در بافت میوه گلابی، شد. **نتیجه‌گیری:** استفاده از مخلوط کارواکرول و ترانس-آنتول را برای مدیریت بیماری آتشک می‌توان در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت باکتری‌کشی، *Erwinia amylovora*

✉ نویسنده مسئول: m.alimanesh@ilam.ac.ir

مقدمه Introduction

بیماری آتشک ناشی از باکتری *Erwinia amylovora* (Winslow et al. 1920) یکی از عوامل اصلی محدود کننده توسعه باغهای درختان میوه دانه‌دار در دنیا شناخته می‌شود (Dagher et al. 2020). باغهای میوه دانه‌دار یکی از مهمترین تولیدات بخش کشاورزی کشور می‌باشند به‌طوری که در تامین نیاز رقمهای مختلف سیب، گلابی و بِه کشور و صادرات این محصولات به کشورهای همسایه از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Marofzadeh et al. 2009). باکتری *E. amylovora* یک باکتری گرم منفی، با سلول‌های منفرد و ابعاد کمتر از دو میکرون با تاژک‌های محیطی می‌باشد. دمای بهینه فعالیت باکتری بین ۲۳ تا ۳۰ درجه سلسیوس می‌باشد (Fontana et al. 2022). این باکتری در فصل بهار از شکوفه‌های گل وارد میزبان شده و با استقرار در اطراف بافت پارانشیم بافت‌های آوندی سبب ایجاد نکروز و در نهایت تخرب بافت می‌شود (Gusberti et al. 2015). بیماری آتشک در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۸ از حومه کرج و سپس از استان کرمان گزارش شده است. بیماری آتشک طی سال‌های اولیه بعد از گزارش، خسارت گسترده‌ای در استان‌های تهران، البرز، قزوین، آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی به بار آورد. به همین دلیل بخش قابل توجهی از باغ‌های گلابی احداث شده با استفاده از رقمهای حساس یا نیمه حساس به بیماری، نظیر رقمهای گلابی شاه‌میوه، دوشس و پیغمبری (سردرودی) طی این سال‌ها ریشه کن شد و توسعه باغ‌های گلابی برای سال‌های زیادی در این مناطق محدود گردید (افیونیان و همکاران، ۱۳۷۹). یک پژوهش در باغهای درختان میوه دانه‌دار استان سمنان نشان داد، بیشترین درصد آلودگی به ترتیب مربوط به درختان بِه (۸۸٪)، گلابی (۵۵٪) و سیب (۲۴٪) است (Ommati and Zaker 2014). در کشور ما فقط ترکیبهای معدنی مسی برای مبارزه با بیماری آتشک موجود می‌باشند ولی این ترکیبهای محافظتی مشکلات خاص خود مانند خطرآبشویی، عدم امکان استفاده در زمان گلدهی و گیاه‌سوزی در غلظتهای بالا را دارند (Iacobellis et al. 2005, Chiriac and Ulea 2011). کاربرد اسانس‌های گیاهی و ترکیبهای سازنده آنها علاوه بر مهار عوامل بیماریزای گیاهی باعث کاهش هزینه‌ها شده و از آلودگی محیط زیست نیز جلوگیری می‌کند (Rezaei 2020). در این پژوهش تاثیر دو ترکیب کارواکرول (Carvacrol) با نام شیمیایی ۵-Isopropyl-2-methylphenol (فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$)، که یک مونوترپنوئید فنلی است که در اسانس پونه کوهی (*Origanum vulgare*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، فلفل (*Lepidium flavum*)، ترنج وحشی (*Citrus aurantium bergamia*) و سایر گیاهان یافت می‌شود و ترانس-آنتول (trans-anethole) با نام (E)-1-(4-Methoxyphenyl) propene (فرمول شیمیایی $C_{10}H_{12}O$) ماده موثره اسانس رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) بر عامل بیماری آتشک مورد بررسی قرار گرفت. دو ترکیب فوق مواد موثره مهم برخی اسانس‌های گیاهان دارویی هستند که اثر ضد باکتریایی آنها اثبات گردیده است (Magi et al. 2015). کارواکرول سبب آسیب غشای پلاسمایی باکتری شده و در ادامه این روند منجر به انحلال نیروی محرکه پروتون و کاهش سنتز ATP می‌شود که این امر خود منجر به کاهش سایر فرآیندهای سلولی وابسته به انرژی از جمله ساخت آنزیم‌ها و توکسین‌ها می‌شود (Nostro and Papalia

2012). کارواکرول علیه برخی باکتری‌های بیمارگر گیاهی نیز اثر ضد باکتریایی از خود نشان داده است، به عنوان مثال اثر ضد میکروبی آن علیه عامل لکه برگی گوجه‌فرنگی (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) به اثبات رسیده است (Kotan et al. 2007). نقش ضد میکروبی ترانس-آنتول علیه برخی از باکتریهای بیمارگر انسان ثابت شده است (Wieczyńska and Cavoski 2018) اما تاکنون اثر مستقیم آن در مهار بیمارگرهای گیاهی مورد آزمایش قرار نگرفته است. هدف این پژوهش آن بود که ترکیبهای ضد باکتری *E. amylovora* با منشاء گیاهی را شناسایی نماید که در غلظت‌های کم اثر ضد باکتریایی داشته باشند تا حجم مصرفی ترکیب حاصل کم باشد و اختلاط آنها سبب افزایش کارایی‌شان گردد، تا برای محیط زیست و انسان خطری نداشته باشند.

مواد و روشها　Materials and Methods

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کُشندگی کارواکرول و ترانس-آنتول بر *E. amylovora*

کارواکرول به صورت مایع و زرد رنگ و ترانس-آنتول به صورت مایع شفاف از شرکت سیگما آلدریچ با خلوص ۹۹ در صد و به ترتیب در حجم‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. آزمایش با روش رقیق‌سازی هر ماده در میکروپلیت (Microdilution broth) ۹۶ خانه سترون در محیط کشت مایع غذایی بر باکتری انجام شد. کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین گردید و غلظتی که روی محیط کشت فاقد کُلنی باکتری بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Rita Proto et al. 2022, Obey et al. 2016).

تعیین بهترین نسبت اختلاطی ترانس-آنتول و کارواکرول

برای تعیین بهترین نسبت اختلاط دو ترکیب ترانس-آنتول و کارواکرول از یافته ها MIC و MBC استفاده شد. غلظت MIC و متوسط داده‌های بین MIC تا MBC (مقادیر یک-دوم MIC و MBC) مورد استفاده قرار گرفت زیرا احتمال رشد باکتری در فاصله غلظتی بین MIC و MBC وجود دارد. از غلظت MBC استفاده نشد زیرا در این غلظت، باکتری مورد نظر هیچ رشدی نداشت. سپس با بررسی نسبت‌های مختلف آن‌ها بیشترین قطر هاله بازدارنده با استفاده از روش دیسک سنجیده شد. پس از تهیه نسبت‌های اختلاطی مقدار ۱۵ میکرولیتر روی دیسک کاغذی شش میلی‌متری قرار داده شد. قبل از آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری در غلظت 10^8 CFU/mL روی محیط کشت آگار غذایی پخش شده بود. در ادامه پتری‌ها درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه قرار گرفتند و پس از مدت ۴۸ ساعت قطر هاله باز دارنده بر اساس میلی‌متر ثبت شد. آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد (Sokovic and Van Griensven 2006).

تعیین حساسیت ترکیب‌ها به اشعه فرابنفش (UV) نور خورشید

آزمون با اندکی تغییرات به روش Fischer et al. (2012) در میکروپلیت ۹۶ خانه انجام پذیرفت.

تعیین تاثیر بهترین نسبت اختلاط ترانس-آنتول و کارواکرول بر شدت بیماری آتشک در میوه گلابی

برای سنجش اثر ضد باکتریایی چهار نسبت اختلاطی، از آزمون بیماریزایی در میوه گلابی رقم اسپادونا استفاده شد. با استفاده از سر سمپلر کریستالی یک حفره در سطح میوه ایجاد شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از غلظت CFU/mL ۱۰^۸ باکتری درون حفره قرار داده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، هر یک از نسبت‌های اختلاطی به مدت چهار ثانیه روی میوه اسپری پاشی گردید. میوه‌ها درون ظروف سربسته حاوی آب مقطر سترون به مدت هفت روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. میزان پیشرفت بیماری به صورت سنجش میزان گسترش ناحیه آلوده (بر حسب میلی‌متر) پیرامون محل مایه‌زنی اندازه‌گیری شد (Zhao et al. 2009).

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شدند. آنالیز آماری داده‌های آزمایش‌ها با استفاده از نرم افزار (SPSS (version 23 انجام پذیرفت. میانگینها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

یافته‌ها Results

حداقل غلظت بازدارندگی و کُشندگی کارواکرول و ترانس-آنتول بر *E. amylovora*

برای ترانس-آنتول مقادیر MIC و MBC به ترتیب برابر با ۹۴ و ۱۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و برای کارواکرول نیز مقادیر MIC و MBC به ترتیب برابر با ۴۷ و ۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در واقع قدرت بازداری از رشد و قدرت کُشندگی ترکیب کارواکرول دو برابر بهتر از ترانس-آنتول بدست آمد که نشان دهنده اثر ضد باکتریایی قوی‌تر این ترکیب علیه *E. amylovora* بود.

بهترین نسبت اختلاط دو ترکیب ترانس-آنتول و کارواکرول

غلظتهای MIC، ترانس-آنتول و کاروارکرول فاقد هلله بازدارنده رشد علیه باکتری *E. amylovora* بودند. برای ترکیب ترانس-آنتول از مقدار ۹۴ (MIC) و ۱۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (میانگین بین MIC و MBC) و برای ترکیب کارواکرول از مقادیر ۴۷ (MIC) و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (میانگین بین MIC و MBC) استفاده شد. در ادامه چهار حالت اختلاط متفاوت تعیین شده مورد سنجش قطر هاله بازدارنده قرار گرفت. یافته ها در جدول یک نشان داده شده است. یافته ها نشان داد، چهار نسبت اختلاطی دارای اثرات متفاوتی در جلوگیری از رشد باکتری *E. amylovora* بودند. بیشترین قطر هاله بازدارنده از رشد با ۱۷/۳ میلی‌متر برای نسبت اختلاطی ۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر کارواکرول و ۱۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترانس-آنتول بدست آمد. بعد از آن نسبت اختلاطی ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کارواکرول و ۱۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترانس-آنتول با قطر هلله بازدارنده ۱۰/۵ میلی‌متر در جایگاه بعدی قرار گرفت. نسبت ۴۷ + ۹۴ بدون هیچ هاله بازدارنده به عنوان کمترین نسبت اختلاطی بدست آمد. یافته ها این آزمایش تائید نمود که درحالت اختلاط، غلظت‌های ترانس-آنتول که مقادیر بیشتری را دارا بود در بروز خاصیت ضد باکتریایی کارواکرول نقش هم‌افزایی از خود نشان دادند.

جدول ۱. قطر هاله بازدارنده از رشد کارواکرول و ترانس- آنتول علیه باکتری *Erwinia amylovora*. مجموعاً شش غلظت مورد بررسی قرار گرفت؛کاربرد جداگانه مواد در غلظت های MIC بود و کاربرد اختلاطی مواد در چهار نسبت شامل MIC و میانگین بین MIC و MBC انجام گردید.

Table 1. Growth inhibition zone diameter of carvacrol and trans-anthole, against *Erwinia amylovora* . In total, six concentrations were investigated; the separate application of substances was in MIC concentrations and the mixed application of substances was carried out in four ratios containing MIC and the average between MIC and MBC.

Mixing ratio		Inhibition zone diameter (mm)
Carvacrol (µg/mL)	trans-Anethole (µg/mL)	
47	-	0 d
-	94	0 d
47	94	0 d
70	94	8.5 c
47	141	17.3 a
70	141	10.5 b

اثر اشعه فرابنفش بر دو ترکیب

دو ترکیب مورد بررسی تحت شرایط آزمایشگاهی دچار تغییرات محسوس در خواص ضد باکتریایی نشدند. یافته ها آزمایش بیانگر آن بود که دو مونوترپن مورد آزمایش از پایداری مناسبی در برابر UV برخوردار بودند. در مورد دو مونوترپن، تغییرات ایجاد شده در اثر UV، اندکی در توان ضد میکروبی آنها موثر بود که فقط در مورد ترانس-آنتول معنی‌دار بود. یافته ها بیانگر آن بود که در مورد تیمار ترانس-آنتول، UV در مقایسه با نمونه شاهد سبب کاهش اثر ضد باکتریایی گردید، بطوری که در تیمار ترانس-آنتول و شاهد به ترتیب چگالی نوری ۰/۷۶۷ و ۰/۷۴۱ محاسبه گردید. در مورد ترکیب کارواکرول، UV به صورت ناچیز سبب افزایش توان ضد باکتریایی شد (چگالی نوری ۰/۷۳۸) که در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود. همچنین در حالت اختلاطی دو ترکیب مونوترپنی در بهترین نسبت کارواکرول + ترانس-آنتول (۴۷ + ۱۴۱) با چگالی نوری ۰/۷۴۳ تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید.

اثر سه نسبت اختلاطی ترانس-آنتول و کارواکرول بر شدت بیماری آتشک در میوه گلابی

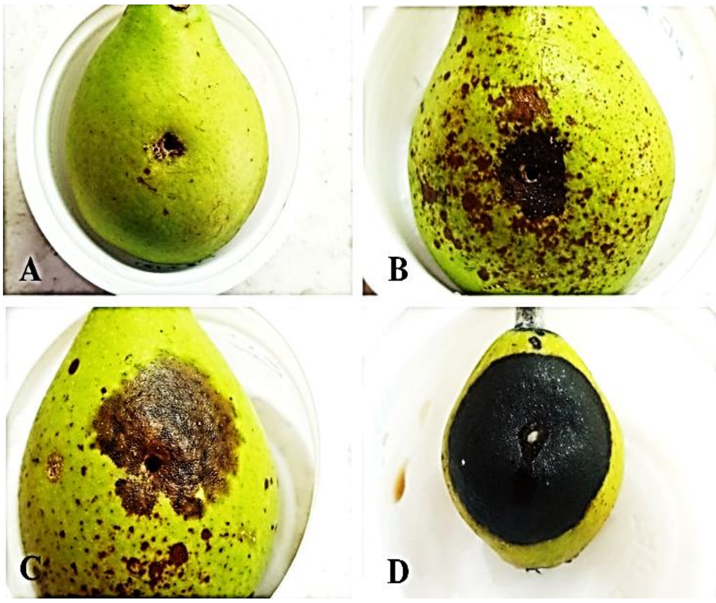
سه نسبت اختلاطی که سبب ایجاد هاله بازدارنده شده بودند، در میوه گلابی (رقم اسپادونا) سبب کاهش نکروز بافت گردیدند(جدول ۲). در تیمار شاهد میزان پیشرفت بیماری به صورت ناحیه نکروز (بافت سیاه) و لهیده پیرامون محل تلقیح مشاهده شد. در مورد سه تیمار نسبت‌های اختلاطی، یافته ها نشان دهنده آن بود که این ترکیبها در مجموع سبب جلوگیری از گسترش بیماری در میوه در مقایسه با شاهد شدند. یافته ها تایید کننده آزمون دیسک بود، بطوری که با کاربرد نسبت اختلاطی ۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر کارواکرول و ۱۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترانس-آنتول کمترین ناحیه نکروز مشاهده شد (شکل ۱). برخی از نسبت‌های به کاربرده شده در میوه نارس دارای اثر گیاه‌سوزی بودند. بروز لکه‌های

جدول ۲. میزان پیشرفت بیماری آتشک روی میوه گلابی (رقم اسپادونا) بر حسب میلی‌متر بعد از مدت زمان هفت روز، تحت تیمار سه نسبت اختلاطی از دو ترکیب کارواکرول و ترانس- آنتول.

Table 2. The progress rate of fire blight disease on pear fruit (Spadona cultivar) in millimeter after a period of seven days, under the treatment of three mixing ratios of two compounds of carvacrol and trans-anthole.

Mixing ratio Carvacrol + trans-Anethole (µg/mL)	Necrotic zone diameter (mm)
47+141	16.3 d
70+141	21 c
70+94	25 b
Check	28.6 a

کوچک سوختگی در نواحی اسپری‌پاشی شده در مدت زمان ۷۲ ساعت بعد از شروع آزمایش، در دو نسبت اختلاطی کارواکرول + ترانس-آنتول (۱۴۱+۷۰ و ۹۴+۷۰) مشاهده شد (شکل ۱). در حقیقت



شکل ۱. میزان پیشرفت بیماری آتشک روی میوه گلابی (رقم اسپادونا) تحت تیمار بهترین نسبت‌های اختلاطی ترانس- آنتول و کارواکرول، بعد از مدت زمان ۷۲ ساعت. نسبت های اختلاط به ترتیب شامل ترانس- آنتول و کارواکرول: **A**. نسبت اختلاط ۴۷ + ۱۴۱، **B**. نسبت اختلاط ۷۰ + ۱۴۱، **C**. نسبت اختلاط ۷۰ + ۹۴، **D**. شاهد (کاربرد باکتری *Erwinia amylovora* به تنهایی).

Figure 1. The progress rate of fire blight disease on pear fruit (Spadona cultivar) under the treatment of the best mixing ratios of trans-anthole and carvacrol, after a period of 72 hours. The mixing ratios are respectively inclusive trans-anthole and carvacrol: A. Mixing ratio 141 + 47, B. Mixing ratio 141 + 70, C. Mixing ratio 70 + 94, D. Control (*Erwinia amylovora* application alone).

غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کارواکرول در ترکیب با ترانس-آنتول سبب بروز نشانه‌های زنگار روی سطح میوه گردید. یافته‌ها این بخش نشان داد هر چند ترکیب کارواکرول دارای اثرات ضد باکتریایی است اما فقط در غلظتMIC در ترکیب با ترانس-آنتول می‌تواند ضمن جلوگیری از رشد باکتری، فاقد نشانه گیاه سوزی در بافت میوه باشد.

بحث Discussion

پژوهش حاضر اولین تحقیق در مورد اثرات کاروارکرول و ترانس-آنتول روی باکتری *E. amylovora* می‌باشد. در مورد کاروارکرول اثر مهار کنندگی روی جنس *Xanthomonas* spp. به اثبات رسیده است (Kotan et al. 2007). تحقیقات اخیر بر روی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه رازیانه (با دارا بودن ترکیب مونوترپنی ترانس-آنتول) مشخص نمود ترانس-آنتول از توان ضد باکتریایی برخوردار است، که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد (Salami et al. 2015). یافته‌های این پژوهش اثبات کننده این موضوع بود که در غلظت‌های استفاده شده، ترکیب ترانس-آنتول فاقد اثر گیاه‌سوزی بر بافت میوه بود اما ترکیب کارواکرول در غلظت‌های بیشتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۷۲ ساعت دارای اثر گیاه‌سوزی بود. این یافته ها نشان داد ظرفیت مهار کنندگی دو مونوترپن مورد آزمایش در صورت اختلاط، علاوه بر افزایش کارایی سبب بی‌اثر شدن اثر گیاه سوزی کارواکرول خواهد شد. از آنجایی که این دو ترکیب در غلظت‌های کمتر ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اثر علیه باکتری *E. amylovora* بودند می‌توان از آنها در زمان گسترش بیماری در بافت در فصل بهار استفاده نمود. در پژوهشی پیرامون بیماری آتشک دو ترکیب مونوترپنی تیمول و ۱و۸-سینئول در بافت شکوفه گلابی سبب بازداری از رشد باکتری *E. amylovora* شدند که تائید کننده یافته‌های این پژوهش است (Akhlaghi et al. 2020). نسبت اختلاطی موثر در مورد دو ترکیب کارواکرول و ترانس-آنتول نشان داد علاوه بر افزایش کارایی، در زمان محلول پاشی نیاز به مقادیر کمتری از این دو ترکیب خواهد بود.

یافته‌های اثر UV بر فعالیت دو ترکیب و بهترین نسب اختلاطی حاکی از پایداری این دو ترکیب در مقابل اشعه فرابنفش است، هر چند که UV به صورت مجزا روی ترکیب ترانس-آنتول اثر منفی داشت، ولی پایدارای این ترکیبها در صورت بکارگیری در محیط باغ باید توسط سایر آزمایش‌ها سنجیده شود. ترکیبها مونوترپنی در مقایسه با سمهای مسی که به صورت تماسی دارای اثر ضد باکتری و قارچی هستند می‌توانند در بافت گیاهی با سرعت بیشتری نفوذ کنند و علاوه بر نقش ضد باکتریایی احتمالا سبب تحریک القای مقاومت شوند. پیرامون اثر مواد موثره اسانسهای گیاهی بر القای مقاومت در مورد برخی بیماری‌های ویروسی و بیماری‌های باکتریایی در گیاه گوجه‌فرنگی پژوهش‌هایی انجام شده است که حاکی از تاثیر مستقیم این ترکیبها بر کاهش بیماری از طریق القای مقاومت می‌باشد. به عنوان مثال کاربرد Eugenol (یک ترکیب بدست آمده از اسانس‌های گیاهی) توانست نشانه ویروس پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی را کاهش دهد (Wang and Fan 2014). یافته‌های یک پژوهش در مورد اثر همزمان کاربرد

Thymol و Acibenzolar-S-methyl علیه باکتری پژمردگی گوجه مشخص نمود علاوه بر کاهش شدت بیماری، میزان برداشت محصول نیز افزایش پیدا کرد (Hong et al. 2011).

نتیجه‌گیری Conclusion

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهند که کارواکرول با MIC و MBC به ترتیب برابر با ۴۷ و ۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیر بیشتری نسبت به ترانس-آنتول با MIC و MBC به ترتیب برابر با ۹۴ و ۱۸۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر *E. amylovora* دارد و نسبت اختلاطی ۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر کارواکرول با ۱۴۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترانس-آنتول بیشترین کاهش شدت بیماری را موجب می‌شود. بنابراین استفاده از این مخلوط کارواکرول و ترانس-آنتول را برای مدیریت بیماری آتشک می‌توان در نظر گرفت.

سپاسگزاری Acknowledgements

بدین وسیله از مساعدت‌ها و تامین مالی پروژه، توسط دانشگاه ایلام و مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی استان سمنان (شاهرود) تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع References

Adaskaveg JE, Gubler WD (2008) Evaluation of new bactericides for control of fire blight of pears caused by *Erwinia amylovora*. Pp. 75– 82. In: California Pear Research Report 2008. California Pear Advisory Board. Online Publication.

Akhlaghi M, Tarighi S, Taheri P (2020) Effect of antimicrobial peptides and monoterpenes on control of fire blight. Spanish Journal of Agricultural Research 18:1-15.

Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology 94:223-253.

Chiriac I, Ulea E (2012) In vitro susceptibility of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. strain isolated from pear to several plant extracts and different pesticides. Cercetări Agronomice in Moldova 1:149.

Dagher F, Olishevska S, Philion V, Zheng J, Deziel E (2020). Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. Heliyon 6:e05222.

Fischer TC, Gosch C, Mirbeth B, Gselmann M, Thallmair V, Stich K (2012) Potent and specific bactericidal effect of juglone (5-Hydroxy-1, 4- naphthoquinone) on the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60:12074−12081.

Fontana R, Macchi G, Caproni A, Sicurella M, Buratto M, Salvatori F, Pappadà M, Manfredini S, Baldisserotto A, Marconi P (2022). Control of *Erwinia amylovora* Growth by *Moringa oleifera* Leaf Extracts: In Vitro and in Planta Effects. Plants, 11:1-19.

Gusberti M, Klemm U, Meier MS, Maurhofer M, Hunger-Glaser, I (2015). Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. International Journal of Environmental Research and Public Health 12:11422-11447.

Hong JC, Momol MT, Ji P, Olson SM, Colee J, Jones JB (2011) Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-S-methyl. Crop Protection 30:1340-1345.

Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F, (2005) Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:57-61.

Kotan R, Dadasoglu F, Kordali S, Cakır A, Dikbas N, Cakmakc R (2007) Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. Journal of Agricultural Technology 3:299-306.

Magi G, Marini E, Facinelli B (2015) Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A *Streptococci*. Front Microbiol. 6:165.

Marofzadeh N, Mohammadi M, Sharifi Tehrani A, Zakeri Z (2009) A study of the efficiency of some serological and PCR-based methods for the identification and detection of *Erwinia amylovora*, the causal agent of pome trees fire blight. Iranian Journal of Plant Protection Science 40:55-64. (In Persian with English Abstract)

Nostro A, Papalia T (2012) Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospectives. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery 7:28–35.

Obey KJ, Wright VA, Orjala J, Kauhanen J, Tikkanen-Kaukanen C (2016) Antimicrobial activity of *Croton macrostachyus* stem bark extracts against several human pathogenic bacteria. Journal of Pathogens 10:1-5.

Ommati F, Zaker M (2014) Role of infected plant parts in development and survival of fire blight of pome fruits (*Erwinia amylovora*). Journal of Applied Research in Plant Protection 3:57-68. (In Persian with English Abstract)

Rezaei R (2020) Effect of eight essential oils on bacterial canker disease in citrus. Plant Pathology Science 9:30-39. (In Persian with English Abstract)

Rita Proto M, Biondi E, Baldo D, Levoni M, Filippini G, Modesto M, Di Vito M, Bugli F, Ratti C, Minardi P, Mattarelli P (2022) Essential Oils and Hydrolates: Potential Tools for Defense against Bacterial Plant Pathogens. Microorganisms 10:1-19.

Salami M, Rahimmalek M, Ehtemam MH, Szumny A, Fabian S, Matkowski A (2015) Essential oil composition, antimicrobial activity and anatomical characteristics of *Foeniculum vulgare* Mill. fruits from different regions of Iran. Journal of Essential Oil-Bearing Plants 19:7

Sokovic M, Van Griensven LJLD (2006) Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology 116:211-224.

Wang C, Fan Y (2014) Eugenol enhances the resistance of tomato against tomato yellow leaf curl virus. Journal of the Science of Food and Agriculture 94:677-82.

Wieczyńska J, Cavoski I (2018) Antimicrobial, antioxidant and sensory features of eugenol, carvacrol and trans-anethole in active packaging for organic ready-to-eat iceberg lettuce. Food Chemistry 259:251-260.

Zhao Y, Wang D, Nakka S, Sundin GW, Korban SS (2009) Systems level analysis of two-component signal transduction systems in *Erwinia amylovora*: Role in virulence, regulation of amylovoran biosynthesis and swarming motility. BMC Genomics 10:1-16.