کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورۀ ۷، شمارۀ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۷ (۴۷-۳۱)
DOI: 10.22059/jbioc.2018.253246.225

# ارزیابی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی علیه باکتری *Erwinia amylovora* و نقش آنها در اِلقای مقاومت در گلابی

**مهدی اخلاقی[۱]، سعید طریقی*[۲] و پریسا طاهری[۳]**
۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۶- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۵)

## چکیده

در پژوهش حاضر اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی هفت گیاه دارویی اَفسنطین، بابونه، زیره سبز، بادرنجبویه، آنغوزه، عرعر و اُکالیپتوس علیه باکتری *Erwinia amylovora* مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه نارس گلابی رقم اسپادونا انجام شد و بیماری‌زاترین جدایه جهت ادامه آزمایش‌ها انتخاب گردید. حساسیت جدایه منتخب به دو ترکیب مسی و پنج آنتی‌بیوتیک سنجیده شد. اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها در سه غلظت مختلف با استفاده از روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی اثر هم‌افزایی با ترکیبات مسی از عصاره گیاه بادرنجبویه که دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بود استفاده شد. همچنین نقش عصاره گیاه بادرنجبویه در القای مقاومت، بر روی نهال گلابی رقم اسپادونا بررسی شد. نتایج نشان داد عصاره بادرنجبویه با میانگین قطر هاله بازدارنده ۱۵/٦٦ میلیمتر دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بر روی جدایه GA3 بود. عصاره گیاهان بابونه و عرعر در تمامی غلظت‌های به‌کار برده شده فاقد اثر کُشندگی بودند. همچنین نتایج نشان از عدم تاثیر هم‌افزایی عصاره بادرنجبویه و ترکیبات مسی مورد آزمایش داشت. نتایج اثرات القای مقاومت در گیاه توسط عصاره باردنجبویه مثبت ارزیابی شد. بررسی آنزیم آنتی‌اُکسیدانتی گایاکول پراکسیداز در هفت زمان مورد بررسی بیانگر افزایش سطح این آنزیم در ۲٤ ساعات اولیه نسبت به شاهد و تیمار باکتری بود. نتایج این تحقیق می‌تواند راهکارهای جدیدی را در تحقیقات آینده به منظور کنترل بیماری آتشک درختان میوه دانه‌دار، از طریق استفاده از مواد موثره گیاهان دارویی ارائه دهد.

**واژه‌های کلیدی:** آتشک، کنترل زیستی، عصاره گیاهی، گیاه دارویی، گایاکول پراکسیداز.

# Evaluating Antibacterial Effect of Plant Extracts Against *Erwinia amylovora* and their Role in Resistance Induction in Pear

**Mahdi akhlaghi[1], Saeed Tarighi*[2], Parissa Taheri[3]**
1.PhD Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Corresponding author: Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
(Received: February 25, 2018 - Accepted: November 26, 2018)

## ABSTRACT

In the present study, antimicrobial effects of the ethanolic herbal extracts of seven medicinal plants including Absinthe, Chamomile, Cumin, Asafoetida, Gum tree, Balm and Tree of heaven against *Erwinia amylovora* bacterium were investigated. Pathogenicity test of the bacterial isolates on the immature pear fruit of the Spadona pear cultivar was performed, and the most pathogenic bacterium isolate was selected for further evaluation. Sensitivity of the selected isolate to two copper compounds and five antibiotics was examined. Antibacterial properties were assessed at three concentrations using the disk-diffusion method. To investigate the synergistic effect of the plant extract with copper compounds, the extract of Balm, which have been indicated maximum antibactericidal effect was used. The Balm plant extract was also tested on the seedling of Spadona pear. The ethanolic extract of Balm had the most significant antibacterial effects with the 15.66 mm diameter average of the zone of inhibition against the GA3 isolate. The bactericidal effects were not exerted by Chamomile and Heaven trees. Moreover, the results indicated no synergistic effects in the plant extracts of Balm and the tested copper compounds. Our results demonstrated the positive stimulating effects of the plant resistance system by the Balm extract. Evaluation of guaiacol peroxidase at seven different intervals indicated the elevated level of GPX within the first 24 hours compared to the control and bacterial treatment. The results of this research can introduce novel suggestions for future researches in order to control of fire blight disease of pome fruit trees via using active components of medicinal plants.

**Key words:** Fire blight, Biological control, Plant extract, Herbal plant, Guaiacol peroxidase

* Corresponding author E-mail: starighi@um.ac.ir

## تازه‌های تحقیق

در این پژوهش سعی شده است با توجه به ظرفیت موجود در ترکیبات طبیعی از آنها به‌عنوان منابع جدید کنترل زیستی بیماری آتشک استفاده شود. در حقیقت هدف اصلی یافتن ترکیباتی است که علاوه بر خواص ضد میکروبی، توانایی اِلقای مقاومتِ گیاه میزبان در سطوح مختلف را داشته باشند. لذا در تحقیق پیش‌رو، پس از جداسازی یک جدایه بیماریزای قوی باکتری *Erwinia amylovora* از استان خراسان رضوی و انتخاب عصاره اتانولی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) با خواص ضد باکتریایی مطلوب از میان عصاره‌های مورد بررسی، نشان داده شد که عصاره فوق در افزایش آنزیم آنتی اکسیدانی گایاکول پراکسیداز (GPOX) بر روی درخت گلابی موثر می‌باشد. همچنین بررسی اثر سینرژیستی عصاره اتانولی گیاه بادرنجبویه و دو ترکیب مسی اُکسی‌کلرورمس و نوردوکس نشان داد ترکیبات فوق فاقد اثر هم‌افزایی (سینرژیستی) می‌باشند.

## مقدمه

هر ساله بیماری آتشک با عامل *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow *et al*. 1920 خسارت فراوانی را در خانواده گل‌سُرخیان اَعم از گیاهان مُثمر (درختان میوه دانه‌دار مانند سیب، گلابی و بِه) و گیاهان زینتی ایجاد می‌کند. کنترل این بیماری مشکل بوده و به سرعت مناطق زیادی را آلوده می‌کند و به صورت اپیدمی در یک منطقه ظاهر می‌شود (Vanneste 2000). در ایران استفاده از پایه‌های بومی و بازارپسند گلابی ولی حساس به بیماری آتشک، خطر گسترش این بیماری را دو چندان کرده است؛ به‌طوری که هم اکنون مناطق اندکی در ایران وجود دارد که بیماری در آنجا گسترش پیدا نکرده است. *E. amylovora* یک باکتری گرم منفی با ابعاد ۰/۸ تا ۱-۲ میکرون، معمولا دارای کپسول، متحرک با چند تاژک پیرامونی می‌باشد. دامنه دمایی رشد بین شش تا سی و دمای بهینه برای فعالیت باکتری بین ۲۳ تا ۳۰ درجه سلسیوس است و در دماهای پایین‌تر (۲-۵) فاقد رشد می‌باشد (Gusberti *et al*. 2015). کنترل این بیماری در مناطقی که این بیماری به آن وارد شده، بسیار مشکل است؛ ولی روند معمول کنترل این بیماری استفاده از اقدامات مدیریتی، مواد شیمیایی مناسب و اخیرا عوامل بیوکنترل می‌باشد. در دنیا تعدادی از ترکیبات شیمیایی علیه بیماری آتشک استفاده شده است که شامل ترکیبات مسی، آنتی بیوتیک‌ها و در برخی از موارد ترکیبات کارباماتی می‌باشد. دو گروه از ترکیبات شیمیایی شامل ترکیبات مسی و آنتی‌بیوتیک‌ها نقش مهمی در کنترل بیماری آتشک دارند. با این حال استفاده از مواد شیمیایی و خصوصا آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از کشورها به‌دلیل خطر بروز مقاومت در جمعیت باکتری و میکروارگانیسم‌های غیر هدف ممنوع شده است (Iacobellis *et al*. 2005). در ایران به‌دلیل هزینه‌بر بودن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها کشاورزان به استفاده از آنها علاقه‌ای نشان نداده‌اند. درصد بالایی از سموم مورد استفاده در کشاورزی ساختگی و شیمیایی بوده و امروزه موضوع جایگزینی سموم شیمیایی با نگاه و رویکرد جدید در مجامع علمی دنیا مطرح است. اخیراً در دنیا، توجه محققین به استفاده از ترکیبات جدید به‌دست‌آمده از گیاهان معطوف شده است. مطالعات انجام گرفته پیرامون خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی علیه بیمارگرهای انسانی از جمله *Escherichia coli* نسبت به عوامل بیماریزای گیاهی گسترده‌تر بوده است. از جمله پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه عوامل بیماریزای گیاهی می‌توان به اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان زرشک (*Berberis vulgaris*) و سیر (*Allium sativum*) بر روی باکتری‌های *Agrobacterium tumefaciens* و *E. amylovora* اشاره نمود (Hayes 1946). همچنین پژوهشگران با بررسی هشت عصاره گیاهی بر روی باکتری عامل آتشک نشان دادند که بیشترین اثر، مربوط به عصاره برگ گیاه شمعدانی عطری

(*Pelargonium odoratissimum*) می‌باشد. در تحقیقات دیگر مشخص گردید که استفاده از عصاره آبی گیاه اسپند (*Peganum harmala*) به‌همراه باکتری‌های آنتاگونیست مانند *Bacillus subtilis* و *Pantoea agglomerans* به‌صورت مه‌پاشی بر روی شکوفه‌های درحال بازشدن درختان گلابی در شرایط باغ می‌تواند سبب کاهش علائم بیماری آتشک گردد (Arafat *et al*. 2015). بررسی‌های انجام شده پیرامون اثرات ضد باکتریایی و القاکنندگی مقاومت تعدادی عصاره گیاهی بر روی درخت به (*Cydonia vulgaris*) و شیر خشت (*Cotoneaster watereri*) نشان داد که عصاره‌های گیاهان دارواش (*Viscum album*) و پاپیتال (*Hedera helix*) به واسطه خصوصیات القاکنندگی مقاومت، سبب کاهش علائم در گیاهان میزبان به و شیر خشت شده‌اند (Mende *et al*. 1994). در تحقیقی که در زمینه تأثیر ترکیب Acibenzolar-S-methyl و عصاره آبی گیاه پاپیتال (به‌عنوان ترکیبات القاکننده مقاومت) بر روی میزبان سیب انجام گرفت نشان داده شد که کلنیزاسیون باکتری در بافت میزبان به واسطه افزایش آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدانت و کیتیناز کاهش پیدا می‌کند (Baysal and Zeller 2005). در مبحث القای مقاومت باید اشاره نمود آنتی‌اُکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که مانع از عملکرد رادیکال‌های آزادشده می‌گردند و از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. آنتی‌اُکسیدان‌ها با دادن الکترون به رادیکال آزاد، آنها را به حالت پایدار خود تبدیل کرده و مانع از اثر مخرب آن‌ها می‌شوند (Karuppanapandian *et al*. 2011). تنش‌های زنده و غیر زنده بر رشد و نمو، ساختار فیزیولوژیک گیاه، سنتز پروتئین‌ها، تنفس سلولی، فعالیت آنزیمی و غیر آنزیمی تأثیر دارند. قرار گرفتن در معرض تنش‌ها سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن[1]، تجمع کالوز، تحریک نسخه‌برداری ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی همچون دیفنسین (پروتئین ضد میکروبی)، آنزیم‌های لیتیک و آنزیم‌های سنتز کننده فیتوآلکسین‌ها می‌شود (Falahzade mmaghani *et al*. 2015). گیاهان برای کاهش اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن از مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می‌کنند. آنزیمی که در تخریب گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد و در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت گایاکول پراکسیداز می‌باشد. گایاکول پراکسیداز (GPOX, EC 1.11.1.7)[2] از اکسیداسیون ترکیبات فنلی مانند گایاکول برای سم‌زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن استفاده می‌کند. گایاکول به عنوان دهنده الکترون به پراکسید هیدروژن عمل می‌کند. این آنزیم در سیتوزول، دیواره سلولی و واکوئل‌ها یافت می‌شود (Karuppanapandian *et al*. 2011). هدف از این مطالعه در حقیقت یافتن ترکیباتی بود که در درجه اول قادر به کنترل باکتری عامل آتشک باشد و در درجه دوم بتواند سامانه مقاومت درختان دانه‌دار را فعال نموده تا با کاربری دوگانه بازده بهتری در کنترل بیماری آتشک فراهم نماید. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش ممکن است به توسعه ترکیبات هم‌راستا با طبیعت کمک کند و به‌عنوان راهبردهای جایگزین در کنترل زیستی بیماری آتشک عمل نماید.

## مواد و روش‌ها

### شرایط کشت و رشد باکتری *Erwinia amylovora*

تعداد ۷۵ جدایه مورد استفاده در این پژوهش از کلکسیون میکروبی گروه گیاه پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. جدایه‌های فوق از سطح باغات درختان میوه دانه‌دار (گلابی، به و زالزاک) استان‌های خراسان‌رضوی، سمنان و اصفهان جداسازی شده بودند. همچنین از جدایه Ea 1.79 (جدا شده از میزبان *Cotoneaster* sp.) به عنوان یک جدایه استاندارد در این پژوهش استفاده شد (Falkenstein *et al*. 1988). به منظور کشت تازه

1. Reactive Oxygen Species

2. IUBMB Enzyme Nomenclature

باکتری، سی میکرولیتر از هر یک از جدایه‌های مورد نظر به سه میلی‌لیتر محیط کشت لوریا - برتانی مایع[3] (لیوفِلیکم، تِرآمو، ایتالیا/۲۵ گرم در لیتر) انتقال داده شد و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس (به مدت ۲۴ ساعت) بر روی دستگاه انکوباتور با تکان یکصد دور در دقیقه نگهداری گردید و با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ششصد نانومتر پس از تعیین غلظت ($10^8$ CFU/ml) برای ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (Bellemann *et al*. 1994).

## تعیین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها با استفاده از میوه نارس گلابی

جدایه‌های باکتری در محیط کشت لوریا - برتانی مایع به شانزده ساعت کشت داده شدند. پس از سانتریفیوژ باکتری (۷۰۰۰ rpm به‌مدت پنج دقیقه) جدایه‌ها در محلول بافر فسفات سالین (PBS[4]) مخلوط شدند و غلظت $1\times10^8$ CFU/ml هر یک از جدایه‌ها تهیه گردید. در ادامه از میوه‌های نارس گلابی رقم اسپادونا (*Pyrus communis* L. cv. spadona) به منظور انجام آزمون بیماری‌زایی استفاده شد. پس از سترون سازی سطح میوه با اتانول هفتاد درصد و خشک شدن سطح میوه به مدت ده دقیقه، با استفاده از سرسمپلر حفره کوچکی در سطح میوه ایجاد گردید و مقدار پنج میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها به‌طور جداگانه روی هر حفره قرار داده شد. میوه‌ها در ظروف پلاستکی درب بسته (به منظور حفظ رطوبت) قرار گرفته و به‌مدت سه تا پنج روز در اتاق رشد[5] (Father electronic X600) (دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نود درصد) نگهداری شدند (Zhao *et al*. 2009). بر اساس نوع و شدت علائم بیماری، مقیاسی بر اساس پنج وضعیت از علائم بیماری تعیین و تقسیم‌بندی به‌عمل آمد. درجه‌بندی فوق براساس میزان پیشرفت بیماری در یک ناحیه دو سانتی‌متر مربعی در سطح میوه انجام شد، بدین ترتیب که نوع A: ۱۰۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم، B: ۷۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم، C: ۵۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم، D: کمتر از ۲۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم، E: فاقد علائم مشخص، در نظر گرفته شد. آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت (Iakimova *et al*. 2013).

## بررسی الگوی حساسیت و مقاومت نسبت به سموم مِسی رایج و آنتی بیوتیک‌ها

جهت بررسی حساسیت و مقاومت بیماری‌زاترین جدایه (GA3) و جدایه Ea 1.79 نسبت به ترکیبات رایج در کنترل این بیماری در مرحله اول از دو ترکیب مسی نوردوکس (CuO) و اُکسی کلرور مس ($H_3ClCu_2$) یا بردو فیکس و در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. در مورد آنتی‌بیوتیک‌ها نیز از پنج آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (STE)، آمپی‌سیلین (AMP)، تتراسایکلین (TET)، کُلرامفنیکل (CHL) و کانامایسین (KAN) در غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر استفاده شد. پس از کشت شانزده ساعته باکتری در محیط کشت لوریا - براتنی مایع و اضافه نمودن غلظت‌های مختلف ترکیبات مسی و آنتی‌بیوتیک‌ها، میکروتیوب‌ها داخل دستگاه شیکر انکوباتور با یکصد دور در قیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت مقدار پنج میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های مورد آزمایش بر روی محیط کشت آگار مغذی[6] انتقال داده شد تا میزان رشد و عدم رشد باکتری سنجیده شود (Abdolahi and Akbarimehr 1999).

## تهیه مواد گیاهی

مطابق با جدول ۱ نمونه‌های گیاهی از رویشگاه طبیعی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

3. Luria-Bertani broth
4 . Phosphate buffered saline
5. Germinator
6. Nutrient agar

شناسایی گونه‌های گیاهی توسط گروه باغبانی و پژوهشکده گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. ابتدا گیاهان فوق با آب مقطر استریل شستشوی سطحی داده شد و در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش نور مستقیم آفتاب خشک شدند. سپس اندام‌های گیاهان با آسیاب پودر و جهت استخراج عصاره مورد استفاده قرار گرفتند (Ghahreman and Attar 1999, Abdulaziz *et al.* 2010).

## فرآیند عصاره‌گیری

ده گرم از اندام‌های گیاهی تهیه شده خرد شد و به طور جداگانه به یکصد میلی‌لیتر اتانول ۸۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت داخل دستگاه شیکر انکوباتور با تکان پنجاه دور در دقیقه قرار گرفت تا به آرامی مخلوط شوند. در ادامه، حلال و مواد گیاهی توسط کاغذ فیلتر آزمایشگاهی (واتمن شماره ۴۱) از هم جدا شدند تا عصاره‌های اولیه به‌دست آید. عصاره درون دستگاه تقطیر در خلأ (Rotary Evaporator) قرار گرفت و در دمای پنجاه درجه سلسیوس حلال تبخیر گردید تا عصاره تغلیظ شده به‌دست آید (Mzida *et al*. 2016).

جدول ۱- گیاهان دارویی مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Medicinal herbs used in current research

| No | Plant species | Family | Common names | Plant part used | Area (Province) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Artemisia absinthium* | Asteraceae | Absinthe | Leaves / Stems | Fars |
| 2 | *Matricaria chamomilla* | Asteraceae | Chamomile | Stems | Razavi Khorasan |
| 3 | *Cuminum cyminum* | Apiaceae | Cumin | Seed | Fars |
| 4 | *Ferula assa-foetida* | Apiaceae | Asafoetida | Leaves / Stems | Semnan |
| 5 | *Eucalyptus globulus* | Myrtaceae | Gum tree | Leaves | Razavi Khorasan |
| 6 | *Ailanthus altissima* | Simaroubaceae | Tree of heaven | Leaves | Razavi Khorasan |
| 7 | *Melissa officinalis* | Lamiaceae | Balm | Leaves | Mazandaran |

## تهیه غلظت‌های عصاره

از حلال دی متیل سولفوکساید[7] (DMSO) یک درصد جهت حل کردن پودر خشک هر یک از عصاره‌ها استفاده شد. در ادامه غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتری در حلال مربوطه تهیه گردید. سپس محلول عصاره هر یک از تیمارهای به‌دست‌آمده با غلظت‌های مشخص از فیلترهای میکروبی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. عصاره‌های فیلتر شده در ظروف شیشه‌ای تیره و سترون در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند (Mortazavi *et al*. 2014).

## بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های مورد آزمایش

برای سنجش اثر ضد میکروبی عصاره‌ها از روش انتشار دیسک (disc diffusion) استفاده شد. در این روش یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $1\times10^{8}$ CFU/ml در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (۲ گرم عصاره گوشت، ۱۷/۵ گرم کازئین هیدرولیزات، ۱/۵ گرم نشاسته و ۱۷ گرم آگار برای یک لیتر) (مرک، آلمان) به وسیله پیپت پاستور ال مانند به صورت یکنواخت گسترش داده شد و پس از گذشت پانزده دقیقه سطح محیط خشک گردید. در سطح محیط کشت از دیسک‌هایی به قطر شش میلیمتر (شرکت طب آزما) که به فاصله دو سانتیمتری از یکدیگر قرار گرفته بودند، استفاده شد. مقدار ۲۵ میکرولیتر از غلظت‌های ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شده، به آرامی روی دیسک‌ها انتقال داده شد. برای شاهد منفی آزمایش از ترکیب DMSO یک درصد استفاده گردید. تمامی محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه قرار داده شدند. کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله بازدارنده رشد، بررسی شدند و قطر هاله بازدارنده برحسب میلیمتر اندازه‌گیری شد (Obey *et al*. 2016, Skocibusic *et al*. 2004).

7. Dimethyl sulfoxide

### آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC [۸]) و حداقل غلظت کُشندگی (MBC [۹])

آزمون MIC در پلیت ۹۶ خانه‌ای سترون و با روش ریز رقت (Microdilution broth) انجام شد. ابتدا از محیط کشت مولر هینتون مایع (مرک، آلمان) یکصد میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف یکصد میکرولیتر از عصاره مورد بررسی اضافه گردید و پس از چند بار پیپت کردن از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک یازده رقیق شد. در آخر به همه چاهک‌ها ده میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل $5\times10^{5}$ CFU/ml اضافه گردید. بعد از تلقیح باکتری، میکروپلیت داخل شیکر انکوباتور با تکان نود دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلیسوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری توسط دستگاه خوانش‌گر الایزا [۱۰] (STAT FAX 2100) در طول موج ۶۳۰ نانومتر بررسی گردید. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید، در نظر گرفته شد (Burt, 2004). پس از کشت محتویات هریک از چاهک‌ها، کمترین رقتی که توانست ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را بکُشد، به عنوان رقت MBC در نظر گرفته شد. آزمایش فوق با سه تکرار انجام پذیرفت (Burt 2004, Obey *et al*. 2016).

### تعیین اثر هم‌افزایی [۱۱] (FIC) [۱۲] عصاره بادرنجبویه و سموم مسی رایج علیه باکتری *E. amylovora*

به منظور بررسی اثر هم‌افزایی عصاره بادرنجبویه و سموم مسی رایج از روش سری رقت چکربورد استفاده شد. میزان یکصد میکرولیتر از عصاره بادرنجبویه (دو برابر MIC، MIC، یک دوم MIC و به همین ترتیب تا یک شصت و چهارم MIC هر ترکیب) درون چاهک‌های هر ردیف میکروپلیت توزیع گردید. سپس مقدار یکصد میکرولیتر از ترکیب مسی درون چاهک‌های هر ردیف میکروپلیت مطابق روش توضیح داده شده در جهت مخالف اضافه گردید و فرآیند مخلوط کردن [۱۳] انجام پذیرفت. در ادامه ده میکرولیتر از سوسپانسیون $1\times10^{8}$ CFU/ml باکتری درون هر چاهک ریخته شده و میکروپلیت درون دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت هشتاد دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس شاخص FIC ترکیبات مورد بررسی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Fic I} = \text{FIC عصاره} + \text{FIC سم مسی} = \frac{\text{MIC عصاره در حالت ترکیبی}}{\text{MIC عصاره به تنهایی}} + \frac{\text{MIC سم مسی درحالت ترکیبی}}{\text{MIC سم مسی به تنهایی}}$$

چنانچه میزان شاخص FIC کمتر از نیم باشد برهمکنش دو ترکیب به عنوان اثر هم‌افزایی (سینرژیست) شناخته خواهد شد. اگر شاخص بین نیم تا یک باشد به عنوان افزایشی، بین یک تا چهار به‌عنوان بی‌اثر و بیشتر از چهار به عنوان برهمکنش آنتاگونیستی در نظر گرفته می‌شود (Turgis *et al*. 2012).

### کشت و تکثیر نهال گلابی و شرایط آلوده سازی گیاه

نهال‌های یکساله گلابی رقم اسپادونا از نهالستان‌های سطح شهر مشهد تهیه و به گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی منتقل شد. جهت تهیه خاک از فرمول مخلوط مساوی خاک زراعی، ماسه رودخانه‌ای و خاکبرگ سرند شده به نسبت‌های مساوی استفاده گردید. پس از تهیه خاک، نهال‌های یکساله در گلدان‌های بیست لیتری پلاستیکی کاشته شدند. به منظور تحریک رشد شاخه‌های فرعی کلیه نهال‌ها پس از انتقال به گلدان از ارتفاع یک متری سربرداری شدند و قبل از آلودگی دو ماه در این وضعیت به رشد ادامه دادند.

8. Minimum inhibitory concentration
9. Minimum bactericidal concentration
10. Microplate Reader
11. Synergic
12. Fractional Inhibitory Concentration
13. Pipetting

مه‌پاشی عصاره بادرنجبویه در مدت زمان ۴۸ ساعت قبل از مایه‌زنی باکتری (زمان صفر و غلظت $1\times10^{8}$ CFU/ml) انجام پذیرفت و پس از طی مراحل فوق، برگ‌ها درون نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل شدند (Ebadi *et al*. 2012).

### استخراج عصاره آنزیمی از بافت گیاهی

برای هر نمونه، پانصد میلی‌گرم از بافت گیاهی درون نیتروژن مایع خرد گردید. سپس سه میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار (pH ۶/۸) به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت پانزده دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس در ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. مایع رویی (عصاره آنزیمی) برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید (Kar and Mishra 1967).

### تعیین پروتئین کل

سنجش پروتئین کل موجود در عصاره گیاه با روش براد فورد (Bradford 1976) انجام گرفت. در این روش یکصد میلی گرم پودر کوماسی بریلیانت بلو (G 250) در پنجاه میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد و سپس روی دستگاه شیکر، یکصد میلی لیتر محلول اسید فسفریک ۸۵ درصد (وزنی/ حجمی) به محلول فوق اضافه شد. با استفاده از آب مقطر، حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد. برای تعیین میزان پروتئین کل در عصاره هر نمونه، مقدار پنج میکرولیتر از عصاره هر نمونه با سه میلی لیتر محلول براد فورد کاملا مخلوط و میزان جذب در طول موج $\lambda$ max= ۵۹۵nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد که بر اساس سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شده بود، محاسبه گردید (Malek Ziaratih *et al*. 2012).

### بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانتی آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از پیش ماده گایاکول و اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکل اندازه‌گیری شد. در این روش کمپلکس واکنش شامل بافر فسفات پنجاه میلی مولار (pH ۷) حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، گایاکول ۱٪، پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ و بیست میکرولیتر از محلول استخراج شده بود. واکنش با اضافه کردن پراکسید هیدروژن آغاز و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به‌مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی بر اساس میزان تتراگایاکول تشکیل شده و با استفاده از ضریب خاموشی تتراگایاکول $mMol^{-1}cm^{-1}$ ۲۵/۵ به دست آمد (Plewa *et al*. 1991).

### تجزیه و تحلیل آماری

آزمون اثر ضد باکتری عصاره‌های مورد آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام پذیرفت (فکتورهای آزمایش شامل جدایه، عصاره گیاهی و غلظت مصرفی بود). به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها برای پارمترهای مورد مطالعه از نرم‌افزار Minitab (version 15) استفاده شد. پس از انجام تجزیه واریانس میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد مقایسه شدند و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel (2013) استفاده شد. همچنین آزمون تغییرات سطح آنزیم گایاکول پراکسیداز با سه تیمار شامل شاهد (آب مقطر)، باکتری و عصاره بادرنجبویه در قالب طرح کاملا تصادفی انجام پذیرفت.

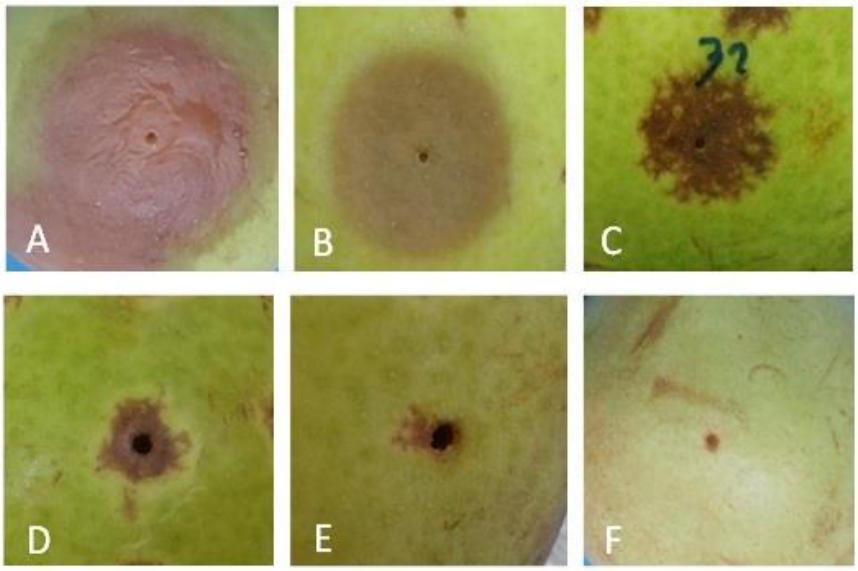
## نتایج

### آزمون بیماری‌زایی و انتخاب بیماری‌زاترین جدایه

آزمون اثبات بیماری‌زایی نشان داد پس از گذشت ۷۲ الی ۱۲۰ ساعت بر روی میوه‌های گلابی نارس، علائم نکروز و لهیدگی ظاهر گردید. جدایه باکتری به‌دست‌آمده از میزبان گلابی و شهر مشهد با نام GA3 به دلیل ایجاد قطر و عمق بیشتر لهیدگی، تخریب بافت میوه و ترشح شیرابه[14] پیرامون قسمت

14. Oozing

تزریق شده به عنوان بیماری‌زاترین جدایه تعیین گردید (نوع A) (شکل ۱). سایر جدایه‌ها نسبت به جدایه GA3، مقادیر کمتری از بیماری‌زایی را نشان دادند. از لحاظ بیماری‌زایی چهار جدایه Sh 33، Mn 26، GA 7 و GA 10 علائم شدید را از خود نشان دادند (نوع B). سایر جدایه‌ها علائم متوسط تا ضعیف را نشان دادند. در این میان تعداد نُه جدایه فاقد علائم مشخص بر روی میوه نارس گلابی رقم اسپادونا بودند. از بیماریزاترین جدایه GA3 برای ادامه آزمایش‌ها استفاده به عمل آمد. سایر اطلاعات و نتایج، شامل میزبان و مناطق نمونه برداری شده در جدول شماره ۲ ذکر شده است.




شکل ۱– تصاویر مربوط به تفکیک جدایه‌ها بر اساس قدرت بیماری‌زایی، نوع A: جدایه با قدرت بیماری‌زایی بسیار شدید، نوع B : جدایه با قدرت بیماری‌زایی شدید، نوع C: جدایه با قدرت بیماری‌زایی متوسط، نوع D: جدایه با علائم ضعیف، نوع E: جدایه بدون علائم مشخص نوع F: شاهد منفی (آب مقطر)

Figure 1- Images of separation of isolates based on pathogenicity, *A:* Isolate with very severe virulence, *B:* Isolate with severe virulence, *C:* Isolate with moderate virulence, *D:* Isolate with low virulence, *E:* Isolate without distinct symptoms, *F:* Negative control (distilled water)

**نتایج حساسیت و مقاومت نسبت به ترکیبات مسی و آنتی بیوتیک‌ها**

نتایج آزمون میزان اثر ترکیبات مسی به عنوان تنها ترکیبات شیمیایی مورد استفاده علیه بیماری آتشک نشان داد که هر دو ترکیب مورد استفاده در غلظت ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع از رشد جدایه‌های GA3 و Ea 1.79 شدند. سایر نتایج نشان داد ترکیب نوردوکس بیشترین اثر ضد باکتریایی را در کنترل جدایه Ea 1.79 داشت، به‌طوری که در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع از رشد جدایه فوق گردید، در حالی که در غلظت مشابه نتوانست مانع از رشد جدایه بیماری‌زای قوی (GA3) شود. سایر نتایج مربوط به حساسیت و مقاومت جدایه‌ها به ترکیبات مسی در جدول ۳ ذکر گردیده است. نتایج آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده، بیانگر این نکته بود که هر پنج آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در غلظت یکصد میکروگرم بر میکرولیتر برای دو جدایه مورد آزمایش کُشنده بودند ولی سه آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، استرپتومایسین و کرامفنیکل فقط در حداقل غلظت به کار برده شده (۲۵ میکروگرم بر میکرولیتر) کُشنده بودند. در مورد دو آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین و کانامایسین در بیشترین غلظت به‌کار برده شده برای باکتری عامل آتشک از توان کُشندگی برخوردار بود، سایر نتایج در جدول ۴ بیان شده است (جدول ۳).

جدول ۲- نام جدایه، مشخصات میزبان، محل جمع آوری و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های *E. amylovora* استفاده در این پژوهش

Table 2. Isolates code, host plant, area of sampling and pathogenicity test for isolates of *E. amylovora* used in this research

| ON | Isolate | Host | Area | Virulence | ON | Isolate | Host | Area | Virulence | ON | Isolate | Host | Area | Virulence |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Sh 7 | Quince | Shahrood | D | 20 | Sh 37 | Quince | Shahrood(R) | D | 39 | Mn 14 | pear | Mashhad(T) | D | 58 | Mn 33 | pear | Mashhad(T) | D |
| 2 | Sh 8 | Quince | Shahrood | E | 21 | Sh 38 | Quince | Shahrood(R) | E | 40 | Mn 15 | pear | Mashhad(T) | D | 59 | Mn 34 | pear | Mashhad(T) | D |
| 3 | Sh 9 | Quince | Shahrood | E | 22 | Ba 31 | Hawthorn | Isfahan | D | 41 | Mn 16 | pear | Mashhad(T) | C | 60 | Mn 35 | pear | Mashhad(T) | E |
| 4 | Sh 10 | Quince | Shahrood | D | 23 | Ba 32 | Hawthorn | Isfahan | D | 42 | Mn 17 | pear | Mashhad(T) | C | 61 | Mn 36 | pear | Mashhad(T) | D |
| 5 | Sh 11 | Quince | Shahrood | D | 24 | Ba 32 | Pear | Isfahan | D | 43 | Mn 18 | pear | Mashhad(T) | D | 62 | Mn 37 | pear | Mashhad(T) | D |
| 6 | Sh 12 | Quince | Shahrood | D | 25 | Ba 34 | Pear | Isfahan | D | 44 | Mn 19 | pear | Mashhad(T) | D | 63 | Mn 38 | pear | Mashhad(T) | E |
| 7 | Sh 16 | Quince | Shahrood | D | 26 | Mn 1 | Pear | Mashhad(T) | D | 45 | Mn 20 | pear | Mashhad(T) | D | 64 | Mn 39 | pear | Mashhad(T) | D |
| 8 | Sh 17 | Quince | Shahrood | D | 27 | Mn 2 | Pear | Mashhad(T) | D | 46 | Mn 21 | pear | Mashhad(T) | E | 65 | Mn 40 | pear | Mashhad(T) | D |
| 9 | Sh 18 | Quince | Shahrood | E | 28 | Mn 3 | Pear | Mashhad(T) | D | 47 | Mn 22 | pear | Mashhad(T) | D | 66 | GA 1 | pear | Mashhad | D |
| 10 | Sh 19 | Quince | Shahrood | C | 29 | Mn 4 | Pear | Mashhad(T) | E | 48 | Mn 23 | pear | Mashhad(T) | D | 67 | GA 2 | pear | Mashhad | C |
| 11 | Sh 20 | pear | Shahrood(B) | C | 30 | Mn 5 | Pear | Mashhad(T) | D | 49 | Mn 24 | pear | Mashhad(T) | D | 68 | GA 3 | pear | Mashhad | A |
| 12 | Sh 27 | pear | Shahrood(B) | D | 31 | Mn 6 | Pear | Mashhad(T) | D | 50 | Mn 25 | pear | Mashhad(T) | D | 69 | GA 4 | pear | Mashhad | C |
| 13 | Sh 28 | pear | Shahrood(B) | D | 32 | Mn 7 | Pear | Mashhad(T) | D | 51 | Mn 26 | pear | Mashhad(T) | B | 70 | GA 5 | pear | Mashhad | C |
| 14 | Sh 29 | pear | Shahrood(B) | C | 33 | Mn 8 | Pear | Mashhad(T) | D | 52 | Mn 27 | pear | Mashhad(T) | C | 71 | GA 6 | pear | Mashhad | D |
| 15 | Sh 30 | pear | Shahrood(B) | D | 34 | Mn 9 | Pear | Mashhad(T) | E | 53 | Mn 28 | pear | Mashhad(T) | C | 72 | GA 7 | pear | Mashhad | B |
| 16 | Sh 32 | pear | Shahrood(B) | D | 35 | Mn 10 | Pear | Mashhad(T) | C | 54 | Mn 29 | pear | Mashhad(T) | D | 73 | GA 8 | pear | Mashhad | C |
| 17 | Sh 33 | Quince | Shahrood(R) | B | 36 | Mn 11 | Pear | Mashhad(T) | C | 55 | Mn 30 | pear | Mashhad(T) | D | 74 | GA 9 | pear | Mashhad | C |
| 18 | Sh 34 | Quince | Shahrood(R) | D | 37 | Mn 12 | Pear | Mashhad(T) | C | 56 | Mn 31 | pear | Mashhad(T) | D | 75 | GA 10 | pear | Mashhad | B |
| 19 | Sh 35 | Quince | Shahrood(R) | D | 38 | Mn 13 | Pear | Mashhad(T) | C | 57 | Mn 32 | pear | Mashhad(T) | C | | | | | |

B: Bastam / R: Royan / T: Torogh.

*A:* Isolate with Very Severe Virulence, *B:* Isolate with Severe Virulence, *C:* Isolate with Moderate Virulence, *D:* Isolate with Low Virulence, *E:* Isolate without Distinct Symptoms

جدول ۳- نتایج حساسیت و مقاومت جدایه‌ها به دو ترکیب مسی رایج در کنترل بیماری آتشک

Table 3. Results of sensitivity and resistance isolate to two common copper compounds in controlling fire blight

| No | Compound | *E. amylovora* (GA3) | | | | | *E. amylovora* (Ea 1.79) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 |
| 1 | Nordox | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| 2 | Copper oxychloride | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - |

Growth : + , Not growth : -

جدول ۴- نتایج حساسیت و مقاومت جدایه های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها بر حسب میکروگرم برمیکرولیتر

Table 4. Results of sensitivity and resistance to antibiotics (µg/µl)

| NO | Antibiotic | *E. amylovora* (GA3) | | | | | *E. amylovora* (Ea 1.79) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| 1 | Tetracycline | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S |
| 2 | Streptomycin | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S |
| 3 | Chloramphenicol | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S |
| 4 | Ampicillin | R | R | R | R | S | R | R | R | R | S |
| 5 | Kanamycin | R | R | R | R | S | R | R | R | R | S |

Susceptible: S / Resistance :R

**نتایج اثر ضد باکتریایی عصاره‌های مورد آزمایش**

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد استفاده از عصاره‌های اتانولی هفت گیاه مورد آزمایش تاثیر معنی‌داری بر جلوگیری از رشد جدایه‌های GA3 و Ea 1.79 (با استفاده از روش انتشار در دیسک) در شرایط آزمایشگاهی داشت (جدول ۶). با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اثرات ساده (جدایه، غلظت و عصاره مورد استفاده) و متقابل (اثر هر یک از فاکتورهای مورد بررسی با یکدیگر)، تاثیر معنی‌داری را بر قطر هاله بازدارنده ایجاد شده توسط عصاره‌های گیاهی مورد استفاده نشان داد ($P < 0.0001$).

بررسی نتایج مقایسه میانگین (سه تکرار) حاصل از قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در غلظت پانصد میلی‌گرم بر میلی لیتر نشان داد در بین عصاره‌های مورد آزمایش، عصاره بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) با میانگین قطر هاله ۱۶/۷۱ و ۱۵/۶۶ میلیمتر به ترتیب برای جدایه‌های Ea 1.79 و GA3 بیشترین اثر ضد باکتریایی را دارا بود. عصاره گیاه آنغوزه (*Ferula assa-foetida*) نیز از اثر ضد میکروبی زیادی برخوردار بود، به‌طوری که در غلظت پانصد میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله عدم رشد با قطر ۱۵/۳۲ و۱۳/۶ میلیمتر به ترتیب برای جدایه‌های Ea 1.79 و GA3 ایجاد نمود و از این جهت دو گیاه فوق، برتری قابل ملاحظه‌ای را در مقایسه با سایر عصاره‌های مورد بررسی از خود نشان دادند. پس از عصاره‌های فوق بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به غلظت پانصد میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی گیاه اُکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*) بود که با ایجاد هاله‌ای با قطر ۱۱/۳۳ و۱۰/۳۴ میلیمتر به‌ترتیب برای جدایه‌های Ea 1.79 و GA3 در حد قابل توجهی توانست از رشد جدایه‌های مورد بررسی جلوگیری کنند. سایر نتایج نشان داد در غلظت یکصد میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ یک از عصاره‌های مورد بررسی، از توان ضد باکتریایی برخوردار نبودند. دیگر نتایج نشان داد عصاره گیاهان عرعر (*Ailanthus altissima*) و بابونه (*Matricaria chamomilla*) فاقد هرگونه اثر ضد میکروبی (در بالاترین غلظت به‌کاربرده شده یعنی پانصد میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) علیه جدایه‌های مورد آزمایش بودند. مقایسه بین سه غلظت تیمارهای مورد آزمایش نشان داد، میانگین قطر هاله بازادرنده در غلظت‌های بیشتر به‌طور معنی‌داری عملکرد بهتری نسبت به غلظت‌های کمتر را دارا بود، در نتیجه افزایش غلظت با قدرت ضد باکتریایی عصاره‌های فوق از یک رابطه مستقیم پیروی می‌کند (جدول ۵).

جدول ۵ – میانگین قطر هاله بازدارنده از رشد جدایه های مورد آزمایش در سه غلظت مورد استفاده به میلیمتر

Table 5. Mean inhibition zone diameter in three concentrations of plant extracts to millimeter

| No | Plant extract / Con (mg/ml) | *E. amylovora* (GA3) | | | *E. amylovora* (Ea 1.79) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 100 | 250 | 500 | 100 | 250 | 500 |
| 1 | *Melissa officinalis* | 0 | 9.1 F | 15.66 AB | 0 | 9.3 EF | 16.71 A |
| 2 | *Ferula assa-foetida* | 0 | 7.4 G | 13.6 C | 0 | 8.5 FG | 15.32 B |
| 3 | *Eucalyptus globulus* | 0 | 0 | 10.34 DF | 0 | 0 | 11.33 D |
| 4 | *Cuminum cyminum* | 0 | 0 | 8.3 FG | 0 | 0 | 9 F |
| 5 | *Artemisia absinthium* | 0 | 0 | 8.1 FG | 0 | 0 | 8.2 FG |
| 6 | *Ailanthus altissima* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | *Matricaria chamomilla* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*The results are the mean of three replicates

*Numbers followed by the same letter are not significantly differentns

جدول ۶ – تجزیه واریانس داده‌های ناشی از بررسی قابلت کنترل‌کنندگی عصاره‌های مورد بررسی بر دو جدایه GA3 و Ea 1.79

Table 6. Analysis of variance of data resulted from assessment of biocontrol abilities of plant extract on tested two isolate GA3 and Ea 1.79

| Source of Variation | DF | Mean squared | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SS | MS | F | P-Value |
| Block | 2 | 0.2 | 0.1 | 0.72 ns | 0.49 |
| Isolate | 1 | 17.53 | 17.53 | 121.9** | < 0.01 |
| Plant extract | 3 | 1018.5 | 169.72 | 1180.04** | < 0.01 |
| Concentration | 2 | 1749.2 | 847.62 | 6081.19** | < 0.01 |
| Isolate × Plant extract | 6 | 24.85 | 4.14 | 28.8** | < 0.01 |
| Isolate × Concentration | 2 | 26.87 | 13.43 | 93.42** | < 0.01 |
| Plant extract × Concentration | 12 | 728.63 | 60.72 | 422.18** | < 0.01 |
| Isolate × Plant extract × Concentration | 12 | 49.9 | 4.15 | 28.92** | < 0.01 |
| Error | 82 | 11.79 | 0.14 | | |
| Total | 125 | | | | |

** Significant in 5% level

## نتایج آزمون‌های حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کُشندگی (MBC)

روش سری رقت در میکروپلیت، برای تعیین کمترین غلظتی که باعث کُشندگی می‌شود، روش دقیق و حساسی می‌باشد و تاکنون برای تعیین ارزیابی خواص ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Scorzoni *et al*. 2007). نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کُشندگی عصاره‌های بادرنجبویه، آنغوزه و اُکالیپتوس در دو جدایه مورد بررسی متفاوت به‌دست آمد. نتایج بیانگر این واقعیت بود که جدایه Ea 1.79 در مقابل اثرات کُشندگی عصاره‌های بادرنجبویه و آنغوزه حساس‌ترین جدایه می‌باشد. عصاره اتانولی بادرنجبویه با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای جدایه Ea 1.79 اثر کُشندگی داشت، در حالی که در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای جدایه GA3 اثر کُشندگی را از خود نشان داد. در واقع نتایج MIC در جدایه فوق نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی برای دو عصاره گیاهی بادرنجبویه و آنغوزه ۶۴/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد؛ در حالی که در جدایه GA3 برای دو عصاره مورد بررسی ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. نتایج MIC و MBC عصاره‌های مورد بررسی در جدول ۶ بیان شده است.

## نتایج اثر هم‌افزایی ضد باکتریایی عصاره‌های بادرنجبویه و ترکیبات مسی

نتایج اثر هم‌افزایی نشان داد که عصاره گیاه بادرنجبویه با دو ترکیب مسی رایج در کنترل بیماری آتشک یعنی ترکیب مسی نوردوکس و اُکسی‌کلرور مس فاقد اثر هم افزایی (سینرژیست) می‌باشد. بررسی غلظت (FIC)[۱۵] در این پژوهش نشان داد که اثر هم‌افزایی در غلظت‌های یک دوم MIC ترکیبات مسی در واکنش با عصاره

15. Fractional Inhibitory Concentration

بادرنجبویه دارای وضعیت بی‌اثر می‌باشد (با توجه به نحوه محاسبه از طریق فرمول مربوطه، (FIC) عددی بیشتر از یک به‌دست آمد). این درحالی است که ترکیبات مورد بررسی برای داشتن خاصیت سینرژستی باید شاخص (FIC)، از ۰/۵ کمتر باشد (جدول ۷).

جدول شماره۶ - نتایج MIC و MBC برای عصاره‌های اتانولی هفت گیاه دارویی مورد آزمایش

Table 6. Results of MIC and MBC for ethanolic plant extracts of seven tested medicinal plants

| No | Plant | *E. amylovora* (GA3) | | *E. amylovora* (Ea1/79) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | MIC(mg/ml) | MBC(mg/ml) | MIC(mg/ml) | MBC(mg/ml) |
| 1 | *Melissa officinalis* | 125 | 250 | 64/5 | 125 |
| 2 | *Ferula assa-foetida* | 125 | 250 | 64/5 | 125 |
| 3 | *Eucalyptus globulus* | 250 | 500 | 125 | 250 |
| 4 | *Cuminum cyminum* | 250 | 500 | 250 | 250 |
| 5 | *Artemisia absinthium* | 250 | 500 | 250 | 500 |
| 6 | *Ailanthus altissima* | - | - | - | - |
| 7 | *Matricaria chamomilla* | - | - | - | - |

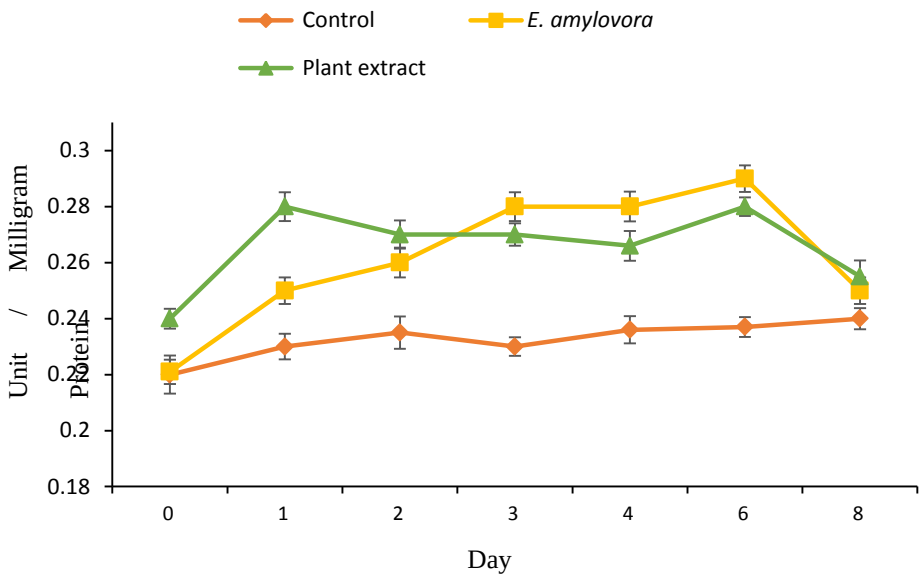
جدول شماره۷ - نتایج اثر هم افزایی عصاره بادرنجبویه و دو ترکیب مسی نوردوکس و اُکسی کلرور مس

Table 7 - Synergistic effects of *M. officinalis* plant extract and two copper compounds of Nordox and Copper oxychloride

| No | Copper Compounds | FIC Index | Type of effect |
|---|---|---|---|
| 1 | Copper oxychloride ($H_3ClCu_2$) | 1.5 | Ineffective |
| 2 | Nordox (CuO) | 1.5 | Ineffective |

## بررسی نتایج تاثیر عصاره بادرنجبویه بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPOX)

نتایج بررسی تغییرات آنزیمی در اثر تیمار عصاره بادرنجبویه در مقایسه با گیاه تحت تیمار باکتری و گیاه شاهد، در شکل ۲ نشان داده شده است.




شکل ۲ – نمودار تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه گلابی؛ تیمار مایه زنی شده با باکتری *E. amylovora*، تیمار مه‌پاشی شده با عصاره گیاه بادرنجبویه و تیمار مه‌پاشی شده با آب (کنترل منفی)

Figure 2. Chart of variations of guaiacol peroxidase enzyme in pear plant: *E. amylovora* inoculated treatment, *M. officinalis* plant extract and fogged water treatment (negative control)

در گیاه شاهد، سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز نشان دهنده پیروی کردن از یک روند ثابت و حداقل تغییرات آنزیمی بود. در اثر مایه‌زنی سرشاخه‌های گیاه گلابی با باکتری *E. amylovora* فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

دارای یک روند افزایشی تا روز سوم و ششم ( U/mg protein ۰/۲۹) بود و از روز ششم به بعد فعالیت آنزیم روند کاهشی را نشان داد. بررسی نتایج گیاه تحت تیمار با عصاره گیاه بادرنجبویه در فواصل زمانی یک روزه نسبت به شاهد (تیمار شده با آب) و تیمار باکتری نشان داد، که سطح آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPOX) از یک روند افزایشی برخوردار بوده است، به‌طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم (U/mg protein ۰/۲۸) در ۲۴ ساعت اولیه پس از تلقیح باکتری (زمان صفر) و ۷۲ ساعت پس از مه‌پاشی عصاره گیاه بادرنجبویه مشاهد گردید. در ادامه فعالیت آنزیم مورد آزمایش تحت تیمار عصاره از روز دوم یک روند کاهشی را نشان داد، اما عمده کاهش از روز ششم به مشاهده شد.

## بحث

تولید و مصرف گیاهان دارویی در صنایع گوناگون به علت داشتن ترکیبات فعال زیستی رو به گسترش است. علاوه بر این، تحقیقات گسترده‌ای آغاز شده که نشان می‌دهد متابولیت‌های ثانویه برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد عوامل بیمارگر گیاهی موثر و جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی می‌باشند ( Alizadeh *et al.* 2014). با این حال باید توجه نمود هزینه تولید و کاربرد عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی بر خلاف مواد شیمیایی، تابعی از میزان پیچیدگی در تولید و فرایند استخراج این ترکیبات می‌باشد و باید جهت کاربرد این ترکیبات در مقیاس مزرعه پیش‌بینی‌ها و برآوردهای لازم را انجام داد. نتایج این پژوهش نشان داد استفاده از عصاره‌های گیاهی که علاوه بر خواص ضد باکتریایی، بتوانند سبب القای مقاومت شوند، می‌تواند به عنوان یک راهکار در کنترل بیمارگرهای گیاهی خصوصا علیه بیماری آتشک مورد استفاده قرار بگیرد. پیرامون بیماری‌زایی جدایه‌های مورد بررسی، تفاوت واضحی مشاهده شد که در مطالعات سایر محققین به آن اشاره شده است (Lee *et al.* 2010). اکثریت جدایه‌های مورد بررسی صرف نظر از اینکه از چه میزبانی جدا شده بودند، بر روی میوه گلابی رقم اسپادونا (یک رقم نیمه حساس) بیماری‌زا بودند. جدایه استاندارد Ea 1.79 در مقایسه با جدایه بیماری‌زای قوی GA3 نسبت به ترکیبات مورد آزمایش، حساسیت بیشتری را نشان داد؛ در حالی که در مورد آنتی‌بیوتیک‌ها تفاوتی مشاهده نگردید. آنتی بیوتیک‌ها به واسطه محل اثر خود در کمترین مقادیر نسبت به ترکیبات مسی و عصاره‌ها از اثر کُشندگی برخوردار بودند؛ ولی استفاده از آنها مشکلاتی را بوجود خواهد آورد. در سال‌های گذشته آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به‌عنوان یکی از معروف‌ترین ترکیبات در کنترل باکتری *E. amylovora* مطرح بوده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه ۱۹۶۰ در کشور آمریکا آغاز شد و اولین جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باغات کالیفرنیا مشاهد شد (Miller and Schroth 1972). مقاومت به آنتی بیوتیک‌هایی مانند استرپتومایسین، در اثر جهش‌های رخ‌داده در ژن‌های ریبوزومی باکتری که در حقیقت محل تاثیر آن هستند ایجاد می‌گردد (Schroth *et al.* 1979). به دلیل هزینه بسیار بالای آنتی‌بیوتیک‌ها، اثرات مضر بر سلامت مصرف کننده و میکروأُرگانیسم‌های خاک، در ایران تاکنون استفاده نشده‌اند (Hasanzadeh 2005). از این رو مقاومت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های پُرمصرف مانند استرپتومایسین در جدایه‌های مورد بررسی در نواحی شمال شرقی ایران دیده نمی‌شود. هر چند عبداللهی و اکبری مهر در بررسی‌های خود، برخی جدایه‌های مقاوم به استرپتومایسین را گزارش نمودند، اما به نظر می‌رسد این مقاومت در برخی از جدایه‌ها مشاهده شده است، ناشی از ورود جدایه‌های مقام کشورهای همسایه و حاشیه مدیترانه به ایران باشد ( Abdolahi and Akbarimehr 1999). در مورد سایر آنتی بیوتیک‌ها مانند آمپی‌سیلین و کاناماسین به نظر می‌رسد که مقاومت طبیعی نسبت به آنها در نواحی نمونه‌برداری شده وجود دارد، بنابراین در صورت استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و ترکیبات مسی بدون شک روند مقاومت باکتریایی در سال‌های آینده بیش از پیش افزایش خواهد یافت و این ترکیبات کارایی لازم را در کنترل بیماری آتشک نخواهد داشت؛ بنابراین به‌کارگیری

ترکیباتی نوین با پایه طبیعی مانند عصاره‌های گیاهی که از اجزاء گوناگون تشکیل شده‌اند، در بحث جلوگیری از مقاومت میکروارگانیسم‌ها بسیار کارآمد خواهد بود. نتایج حاصل از به‌کارگیری ترکیبات ضد میکروبی (عصاره‌های گیاهی) در این پژوهش نشان داد که برخی عصاره‌های مورد بررسی در کنترل باکتری *E. amylovora* موثر می‌باشند. بر طبق مطالعات قبلی انجام شده در ایران (Saneinasab *et al*. 2015) با بررسی اثر دوازده عصاره اتانولی علیه باکتری عامل آتشک مشخص شد که بیشترین خاصیت بازدارندگی مربوط به عصاره سیر (*Allium sativum*) و کمترین اثر مربوط به عصاره بومادران (*Achillea millefolium*) و بابونه (*Matricaria chamomilla*) می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (Saneinasab *et al*. 2015). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره گیاهان مورد بررسی خصوصا گیاهان خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌تواند به عنوان مواد طبیعی جهت جایگزینی ترکیبات شیمیایی رایج (ترکیبات مسی) مورد بهره‌برداری قرار گیرند. ترکیبات فیتوشیمیایی عمده‌ای در گیاهان وجود دارد که خواص ضد میکروبی گیاهان را به آن نسبت می‌دهند که شامل فنل‌ها و پلی‌فنل‌ها (کینون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها...)، توکوفرول‌ها، ترپنوئیدها، اسانس‌ها، آلکالوئیدها و لکتین‌ها و پروتئین‌ها می‌باشند (Dholwani *et al*. 2008). سایر پژوهش‌های علمی نشان داده است که برگ بادرنجبویه محتوی ترکیبات پلی‌فنولیک شامل رزماریک اسید و اسید کافیئک، آلدئید مونوترپنوئید، فلاونوییدهایی مانند کوئرسترین و لوتئولین، ترترپین‌ها، تانن‌ها و ترکیبات اسانسی مهم مانند سیترال و کاریوفیلن‌اُکسید می‌باشد (Chung *et al*. 2010). گیاه بادرنجبویه به واسطه مواد فوق، مانند دیگر گیاهان خانواده نعناعیان از خواص ضد میکروبی (فنل‌ها) و آنتی اکسیدانی (توکوفرول‌ها) مناسبی در مقایسه با دیگر گیاهان مورد بررسی در این پژوهش برخوردار بود. اگر چه به‌کارگیری عصاره‌ها در شرایط خاص امکان‌پذیر است اما کاربرد عصاره‌هایی مانند بادرنجبویه در شرایط طبیعی درختان میوه دانه‌دار (باغات) مستلزم تحقیقات گسترده‌تری می‌باشد. بررسی‌های دقیق‌تر پیرامون اثر هم‌افزایی عصاره بادرنجبویه و ترکیبات مسی از عدم تاثیر هم‌افزایی ترکیبات فوق حکایت داشت، هر چند بیشتر مطالعات صورت گرفته در این زمینه، درمورد اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک‌ها با اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی علیه بیمارگرهای مختلف بوده است (Langeveld *et al*. 2014). به عنوان نمونه در تحقیقات گذشته اثرات هم افزایی آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین[16] با اسانس دارچین و آنتی‌بیوتیک کُلرامفنیکل با اسانس گیاه مرزه، بر ضد باکتری *E. coli* مورد سنجش قرار گرفته‌اند (Bassolé and Juliani 2012)، اما اثرات هم افزایی بین عصاره‌ها و ترکیبات مسی کمتر مورد توجه بوده است و بیشتر بحث مقایسه عصاره‌ها و اسانس‌ها با سموم مطرح بوده است. در بحث تغییرات آنزیمی در گیاه میزبان بعد از حمله عوامل بیمارگر سلسله واکنش‌هایی در گیاه میزبان رخ می‌دهد که این تغییرات می‌توانند در اثر سایر محرک‌ها نیز ایجاد شود. پیرامون مواد محرک مقاومت، ماده‌ای در عصاره انگور یافت شد که موجب افزایش فعالیت گلوکونازها می‌شد (Goupil *et al*. 2012). همچنین هِرمان و همکاران نشان دادند که استفاده از برخی مواد القاکننده مقاومت در گیاه میزبان باعث افزایش بیان ژن‌های تولید کننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis-related protein) می‌شود و در نهایت مقاومت به عوامل بیماریزا افزایش پیدا می‌کند (Herman *et al*. 2008). دیگر محققین نشان دادند که کاربرد ماده بنزوتیادیازول (BTH) در درختان سیب می‌تواند سطح مقاومت درختان را نسبت به بیماری آتشک با نرخ ثابت با فعال کردن آنزیم‌های پراکسیداز و گلوکاناز افزایش دهد (Brisset *et al*. 2000). همچنین مشخص گردید که کاربرد ترکیب Acibenzolar-S-methyl سبب ایجاد یک مقاومت عمومی به طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی می‌گردد (Brisset *et al*. 2000). در مورد کاربرد عصاره‌های گیاهی در تحقیقات گذشته مشخص شد که کاربرد عصاره آبی گیاه پاپیتال به تنهایی و همراه با عصاره‌های دیگر در کنترل بیماری آتشک بسیار موثر می‌باشد (Mosch *et al*. 1993). در پژوهش دیگری مشخص گردید به‌کارگیری عصاره گیاه پاپیتال موجب ایجاد مقاومت در برابر باکتری *E. amylovora* می‌گردد و

16. Piperacillin

افزایش قابل توجهی از فعالیت اکسیداسیون پلی‌فنول‌ها در برگ نهال درخت سیب رقم M26 را نسبت به تیمار آب موجب می‌گردد (Baysal *et al*. 2002). بنابراین، مکانیسم عمل متفاوت برای عصاره‌های گیاهی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. گیاهان قبل از وقوع بیماری آتشک، جهت فعال شدن مقاومت القایی، نیاز به زمان دارند. در اغلب موارد، این فاصله بین یک تا هفت روز در نظر گرفته می‌شود. در پژوهشی که در این زمینه انجام گرفت بهترین روش حفاظت در مقابل باکتری *E. amylovora* هنگامی بود که ترکیب Acibenzolar-S-methyl ۴۸ ساعت قبل از تلقیح استفاده شد (Baysal and Zeller 2005). از این رو به‌کارگیری عصاره گیاه بادرنجبویه در مدت زمان فوق (۴۸ ساعت) دارای اثرات مطلوبی بود که بررسی اثرات عصاره در زمان‌های کمتر و بیشتر از ۴۸ ساعت می‌تواند زمینه ساز تحقیقات آینده باشد. همچنین در این پژوهش مشخص گردید استفاده از عصاره بادرنجبویه در نقش یک ترکیب تحریک کننده مقاومت در میزبان گلابی، در مدت زمان ۲۴ ساعت می‌تواند سبب افزایش آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به شاهد شود اما با گذشت زمان میزان تولید آنزیم رو به کاهش می‌گذارد. با توجه به اینکه عصاره‌های گیاهی حاوی ترکیبات متنوع هستند هر یک از این ترکیبات ممکن است به صورت جداگانه از خواص ضد میکروبی و القایی متفاوتی برخوردار باشد، لذا نیاز به پژوهش‌های بیشتر جهت شناسایی و آزمایش بر روی اجزای تشکیل دهنده عصاره بادرنجبویه می‌باشد. در انتها می‌توان نتیجه گرفت استفاده از موادی که توانایی القای مقاومت را داشته باشند، یک امر مهم در کنترل بیماری‌ها محسوب می‌شود. حال اگر این گروه از ترکیبات خود خاصیت ضد میکروبی داشته باشند، می‌توانند در کنترل بیماری‌ها بسیار مفید واقع شوند. همچنین لازم است در مورد کنترل بیماری آتشک با استفاده از ترکیبات استحصالی گیاهان، تحقیقات بیشتری صورت پذیرد و اثرات آنها مورد پژوهش‌های محیطی و مزرعه‌ای قرار گیرد.

**REFERENCE**


**Abdolahi H, Akbarimehr H** (1999) Evaluation of fire blight resistance in some Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes. I. isolation, evaluation and selection of causal bacterial (*Erwinia amylovora*) isolation. Seed and Plant Improvement Journal 24(3) (In Persian).

**Al-Askar A, Rashad Y** (2010) Efficacy of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* on Pea Journal of Plant Protection Research 50 (3):239-243.

**Alizade H, Frzanhe M, Azami Z** (2014) Effect of *Cinnamon zeylanicum* essential oil nano emulsion on reducing After-harvest caries of strawberry fruit. Biological Control of Pests and Plant Diseases 4 (1):57-64 (In Persian).

**Arafat AH, Hanan SA, Rabab AM** (2015). Antibacterial activity of antagonistic bacteria and plant extract on *Erwinia amylovora* the pathogen of fire blight disease in Egypt. International Journal of Phytopathology. 04 (02): 73-79.

**Bandeoglu E, Eyidogan F, Yucel M, Oktem HA** (2004) Antioxidant responses of shoots and of lentil to NaCl- salinity stress. Plant Growth Regulation 42(1): 69-77.

**Baysal O, Laux P, Zeller W** (2002) Studies on induced resistance (IR) effect of the plant extract (*Hedera helix*) against fire blight. In: APS plant pathology meeting, international conference in plant pathology Caribbean division in Cuba p. 82.

**Baysala O, Zeller W** (2005) Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). Physiological and Molecular Plant Pathology 65 (2004) 305–315

**Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K** (1994) Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. International Journal Biological Macromolecules 16:290-296.

**Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of Protein utilizing the principle of protein –type binding. Anal of Biochemistry 72, 248-254.

**Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP** (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. European Journal of Plant

Pathology 106: 529-536.

**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** (2011) 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).

**Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJH, Kim KH, Lee, SJ** (2010) Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. British Journal of Nutrition 104 (02):180-188.

**Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR** (2008) A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. Indian Journal pharmacol 40: 49-58.

**Ebadi A, Erfani J, Abdolahi H, Fatahi-moghadam M** (2012). Investigating the changes of antioxidant and phenol enzymes in some pear tree cultivars infected with fire blight disease. Journal of horticulture science 45(2): 127-136 (In Persian).

**Elshazly A, Hussein K** (1999) Chemical analysis and biological activities of essential oil of *Teucrium leococladom* (Lamiaceae). Biochemical Systematics and Ecology 32: 665-74.

**Fallahzadeh Mamaghani V, Ahmadzadeh M, Behbodi K** (2015) The effect of some known Microbe-associated molecular patterns-MAMPs on increasing the resistance of Arabidopsis. Biological Control of Pests and Plant Diseases 4 (1):13-22 (In Persian).

**Falkenstein H, Bellemann P, Walter S, Zeller W, Geider K** (1988) Identification of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. Applied and Environmental Microbiology 54, 2798–802.

**Ghahreman A, Attar F** (1999) Biodiversity of Plant Species in Iran. Tehran University Publications. Tehran, Iran. 1176 p.

**Goupil P, Benouaret R, Charrier O, Halle A, Richard C, Eyheraguibel B, Thiery D, Ledoigt G** (2012) Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. Ecotoxicology 21: 1541-1549.

**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

**Hayes LE** (1964) Survey of higher plant for presence of antibacterial substance. Oil and Gas Journal 108: 408 - 11

**Herman MAB, Davidson JK, Smart CD** (2008) Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. Phytopathology 98: 1226-1232.

**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.

**Iakimova ET, Sobiczewski P, Michalczuk L, Wegrzynowicz-Lesiak E, Mikici_nski A, Woltering EJ** (2013) Morphological and biochemical characterization of *Erwinia amylovora* induced hypersensitive cell death in apple leaves. Plant Physiology and Biochemistry 63: 292-305

**Kar M, Mishra D** (1976) Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57: 315-319.

**Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W** (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, 32 and scavenging mechanisms. Australian Journal of crop science 5(6): 709-725.

**Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA** (2014) Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. Critical Reviews in Microbiology 40 (1): 76-94.

**Lee SA, Ngugi HK, Halbrendt NO, O Keefe G, Lehman B, Travis JW, Sinn JP, McNellis TW** (2010) Virulence charateristics accounting for fire blight disease severity in apple trees and seedlings. Phytopathology 100: 539-550.

**Malek-Ziaratih H, Sahebani N, Etebarian HR** (2012) Biological Control and Systemic Induction of Peroxidase and Polyphenol oxidase by *Trichoderma harzianum* in Tomato Plants Infected with Nematode *Meloidogyne javanica*. Biological Control of Pests and Plant Diseases 1(72-61)

**Mende A, Mosch J, Zeller W** (1994) On the induced resistance of plant extracts to fire blight (*Erwinia* amylovora). Journal of Plant Diseases and Protection 101:141-147.

**Miller TD, Schroth MN** (1972) Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopathology 62: 1175-1182.

**Mosch J, Mende A, Zeller W, Rieck M, Ulrich W** (1993) Plant extracts with a resistance induction effect against fire blight (*Erwinia amylovora*). Acta Horticulture 338:389–395.

**Mzida M, Ben Khedira S, Ben Salemb M, Regaiegb W, Rebaia T** (2016) Antioxidant and antimicrobial

activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. Pharmaceutical Biology 55(1): 775–781.

**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 2016:1453428.

**Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB** (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. Journal of Nutrition 131: 66-71.

**Parida AK, Das AB** (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60(3): 324-49.

**Plewa MJ, Smith SR, Wanger ED** (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhabitation tobacco cell peroxidase. Mutant Research 247(1): 57-64.

**Saneinasab S, Hosseinipour A, Majidi F, Masoumi M** (2015) In vitro antibacterial activity of some plant extracts against *Erwinia amylovora*. *In*: 1th international and 9th national biotechnology congress of Islamic republic of Iran, May 24-26. Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

**Schroth MN, Thomson SV, Moller WJ** (1979) Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. Phytopathology 69: 565-568

**Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS** (2007) Comparative study of disk diffusion and Microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, 28(1): 25-34.

**Shafei M, Sharifan A, Aghazade Meshki M** (2012) Composition of essential oil of *Ziziphora clinopodioides* and its antimicrobial activity on *Kluyveromyces marxianus*. Food Technology and Nutrition 9(1).

**Sokovic M, Van Griensven L** (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.

**Tang W, Newton RJ** (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) Zygotic embryos. Plant Physiology and Biochemistry 43(8): 760-769.

**Turgis M, Vu KD, Dupont C, Lacroix M** (2012) Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. Food Research International 48 (2): 696-702.

**Vanneste JL** (2000) Fire blight, the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20083014931.

**Venisse JS, Gullner G, Brisset MN** (2001) Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125(4): 2164-72.

**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 10:245**.**

**Zohour paralak E** (2010). Study of Fire blight disease using pathogenicity and streptomycin resistance diversity. Plant Protection Journal. 2 (2): 161-166 (In Persian).