# تاثیر ضد باکتریایی عصاره آبی چند گیاه دارویی روی *Xanthomonas translucens* و *X. citri* subsp. *citri* در شرایط آزمایشگاه و کارایی آن‌ها در کنترل لکه نواری باکتریایی گندم در شرایط گلخانه

آزاده روشنی[۱] و فاطمه یوسفی کوپائی[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- * **نویسنده مسوول:** استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران (yousefi@sku.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۱

**چکیده**

**لکه نواری گندم با عامل *Xanthomonas translucens* و شانکر آسیایی مرکبات با عامل *Xanthomonas citri* subsp. *citri* دو بیماری باکتریایی مهم هستند که در ایران نیز خسارت قابل توجهی وارد می‌سازند. معمولا برای کنترل بیماری‌های باکتریایی ترکیبات مسی توصیه می‌شود ولی به دلیل مشکل گیاه‌سوزی و ظهور سویه‌های باکتریایی مقاوم، کشف ترکیبات ضد میکروبی جدید ضروری است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف یافتن عصاره‌ی گیاهی موثر در کنترل دو باکتری *X. translucens* و *X. citri* subsp. *citri* انجام شد. در ابتدا جدایه‌های باکتریایی با انجام آزمون‌های فنوتیپی، مولکولی و بیماری‌زایی شناسایی شدند. سپس در شرایط آزمایشگاه کارایی عصاره آبی پنج گیاه دارویی در کنترل رشد این دو باکتری به روش نشت از چاهک بررسی و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی به روش سری رقت تعیین شد. براساس نتایج مرحله آزمایشگاهی، دو عصاره انتخاب و اثر آن‌ها در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط گلخانه ارزیابی شد. در شرایط آزمایشگاهی، عصاره‌های گل‌اروانه (*Hymenocrater longiflorus* Benth)، بومادران (*Achillea millefolium* L.)، سیر (*Allium sativum* L.) و چز (*Teucrium polium* L.) روی هر دو باکتری مورد بررسی به درجات مختلف اثر بازدارندگی نشان دادند ولی مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) روی هیچ کدام اثر بازدارنده نداشت. روی *X. translucens* عصاره آبی گل‌اروانه و بومادران به ترتیب با قطر هاله بازدارنده ۳۱ و ۲٤ میلی‌متر و روی *X. citri* عصاره چز و گل‌اروانه به ترتیب با قطر هاله بازدارنده ۲۵ و ۲۲ میلی‌متر دارای بیش‌ترین اثر بازدارندگی بودند. شدت بازدارندگی متفاوت بعضی از عصاره‌ها روی دو گونه نشان می‌دهد که کارایی عصاره‌ها می‌تواند بسته به گونه باکتری متفاوت باشد. بنابراین برای معرفی هر عصاره یا ترکیب گیاهی به عنوان ترکیب ضد میکروبی برای هر بیمارگر انجام آزمایشات غربال‌گری و تعیین غلظت مناسب ضروری است. نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای بیان‌گر تأثیر موفقیت‌آمیز کاربرد بومادران و گل‌اروانه در کاهش معنی‌دار درصد وقوع و درصد شدت بیماری بود و بنابراین این دو گیاه گزینه‌های مناسبی برای مطالعات بیش‌تر به‌منظور سنتز ترکیبات ضد میکروبی ایمن جهت مدیریت بیماری لکه نواری گندم هستند.**

***کلیدواژها: بازدارندگی از رشد، حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی***

دبیر تخصصی: دکتر میلاد آئینی

## مقدمه

طبق پیش‌بینی‌های انجام شده جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۷ میلیارد خواهد رسید و یکی از چالش‌های پیش‌رو تأمین مواد غذایی این جمعیت است. مساله‌ی دیگر، تهدید سلامت موجودات زنده توسط آفت‌کش‌های شیمیایی است که بقایای مضرشان گاهاً به مدت طولانی در طبیعت باقی می‌ماند. برای رفع این چالش‌ها لازم است استراتژی‌های جدیدی برای افزایش بهره‌وری و پایداری عملیات کشاورزی اتخاذ شود. از راه‌کارهای افزایش بهره‌وری، افزایش عملکرد در واحد سطح با کاربرد کودهای آلی و آفت‌کش‌های زیستی است. آفت‌کش‌های زیستی بر پایه میکروارگانیسم‌ها یا سایر مواد طبیعی سنتز شده‌اند و برای کاهش خسارت بدون تأثیر سوء روی کیفیت محصول، بسیار امیدبخش هستند (Kumar et al., 2021). در این راستا عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی به عنوان منابع مهم برای تولید و توسعه آفت‌کش‌های زیستی مطرح هستند (Cavoski et al., 2011). آفت‌کش‌های زیستی اگرچه ممکن است نتوانند جایگزین سموم شیمیایی شوند ولی با به کارگیری صحیح باعث کاهش حجم سم مصرفی و حفظ سلامت انسان و محیط می‌شوند (Copping, 2009).

جنس زانتوموناس یکی از جنس‌های مهم شاخه Proteobacteria می‌باشدکه در انواع گیاهان سبب بیماری می‌شود. بیماری شانکر آسیایی مرکبات و لکه نواری گندم و جو از بیماری‌های مهم حاصل از این جنس می‌باشند که در ایران نیز اهمیت دارند.

عامل شانکر آسیایی مرکبات *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Gabriel (*Xcc*) است. علائم بیماری شامل تشکیل زخم‌های نکروزه زگیل‌مانند احاطه شده با بافت‌های آب‌سوخته و یک هاله سبزرد روی برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه است. در ارقام حساس منجر به ریزش برگ، سرخشکیدگی شاخه، ریزش زود هنگام میوه و کاهش بازارپسندی میوه می‌شود. روش‌های سنتی کنترل این بیماری مبتنی بر برقراری مقررات قرنطینه‌ای، حذف درختان آلوده و استفاده از سموم مسی جهت کاهش جمعیت باکتری بوده است. با این حال استفاده‌ی طولانی مدت از سموم مسی منجر به بروز مقاومت در سویه‌ها می‌شود (Villamizar and Caicedo, 2019). با توجه به مشکل بروز مقاومت به سموم مسی، جست‌وجو برای یافتن ترکیبات ضد باکتریایی جدید مورد توجه و تاکید محققین قرار گرفته است.

لکه نواری باکتریایی، مهم‌ترین بیماری بذرزاد گندم و دیگر غلات دانه‌ریزی است که در مناطقی با آب و هوای گرم و مرطوب رشد می‌کنند. بیماری با کاهش سطح فتوسنتزکننده منجر به کاهش کمیت و کیفیت دانه‌ها می‌شود. عامل بیماری لکه نواری غلات پاتوارهای مختلف *X. translucens* شامل *hordei*، *undulosa*، *cerealis*، *secalis* و *translucens* می‌باشد که به علت عدم وجود ویژگی مشخص فنوتیپی، ژنوتیپی یا بیماری‌زایی جهت تمایز آن‌ها همه در یک گروه با عنوان گروه *translucens* قرار داده شدند (Vauterin et al., 1992). علائم بیماری به‌صورت لکه‌های آب‌گزیده و کشیده در امتداد رگبرگ‌ها ظاهر می‌شود که در صورت به‌هم پیوستن لکه‌ها زخم‌های نکروتیک ایجاد می‌شود (Duveiller et al., 1997). پیشرفت بیماری نیازمند رطوبت بوده و بارندگی و آبیاری بارانی بیماری را گسترش می‌دهد. بیماری در شرایط گرم و مرطوب، مخرب و خطرناک بوده و خسارت قابل توجهی را وارد می‌سازد. با توجه به حضور گسترده باکتری عامل بیماری در اغلب کشورهای جهان، خسارت بیماری در شرایط مناسب آب و هوایی قابل توجه بوده و می تواند همه‌گیری‌های گسترده و خطرناک ایجاد کند (Forster and Schaad, 1988). از آن جایی که مدت زمان بقاء بیمارگر در بقایای گیاهی کوتاه است، تناوب زراعی نیز به عنوان راه‌کار کنترل مطرح است. مطالعات محدودی در زمینه‌ی استفاده از ترکیبات شیمیایی در کنترل لکه نواری انجام شده است. تأثیر ترکیبات سیلیکونی بر روی توسعه‌ی بیماری مورد بررسی قرار گرفته است، ولی نتایج قطعی و واضحی

حاصل نشده است (Silva et al., 2010). باکتری‌کش‌های مسی و آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل بیماری‌های باکتریایی با عامل *Xanthomonas* spp. توصیه شده است ولی تأثیر آن روی گونه‌های *Xanthomonas* بیماری‌زا در غلات بررسی نشده است (Lamichhane et al., 2018). بنابراین یافتن ترکیبات ضد میکروبی ایمن و موثر جهت کنترل این باکتری امری ضروری به نظر می‌رسد.

در مورد بررسی تأثیر عصاره‌های گیاهی در کنترل رشد باکتری مولد شانکر مرکبات چندین مطالعه انجام شده است. به طور مثال، اثر بازدارندگی عصاره‌های آبی بذور گیاه زنیان (*Trachyspermun ammi* Sprague)، پیاز (*Allium fistulosum* L.) و تاغ (*Haloxylon ammodendron* Bunge) علیه باکتری *X. citri* subsp. *citri* با روش نشت در آگار بررسی شده است و بر اساس نتایج عصاره‌های تغلیظ شده بذور زنیان و پیازچه به عنوان عصاره‌های دارای قدرت بازداری از رشد این باکتری معرفی شدند (Amiri henzaei, 2018). همچنین با بررسی تأثیر عصاره‌ی آبی، اتانولی و متانولی چند گیاه از جمله چریش (*Azadirachta indica* Jussieu)، زنجبیل (*Zingiber officinale* Roscoe)، ریحان مقدس (*Ocimum tenuiflorum* L.) و برگ درخت کاری (*Murraya koenigii* Sprengel)، عصاره متانولی و آبی گیاه چریش با قطر هاله‌ی بازدارنده‌ی به ترتیب ۱۴/۶ و ۱۱/۶میلی‌متر دارای بیش‌ترین فعالیت بازدارندگی علیه باکتری مولد شانکر مرکبات گزارش شده‌اند (Gadhe et al., 2016). در مطالعه‌ای دیگر با بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی آبی اکالیپتوس (*Eucalyptus camelduensis* Dehnh.)، پیاز (*Allium cepa* L.)، سیر (*Allium sativum* L.)، چریش، شیشم (*Dalbergia sissoo* Roxb.) و زیتون تلخ (*Melia azedarach* L.) روی این باکتری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه، عصاره‌ی سیر و چریش به عنوان موثرترین گزینه معرفی شدند (Tahir et al., 2016). در مورد تأثیر عصاره‌های گیاهی بر باکتری عامل لکه نواری غلات مطالعه‌ی کم‌تری صورت گرفته است. Beyki and Alizadeh (2006) اثر اسانس و عصاره آبی چند گیاه را بر دو پاتوار *cerealis* و *hordei* مورد بررسی قرار دادند. طبق گزارش ایشان اثر ضد باکتریایی عصاره و اسانس گیاهان روی دو پاتوار مورد بررسی تقریبا شبیه بود و در واقع دو پاتوار از نظر حساسیت به این ترکیبات تفاوتی نداشتند. اسانس‌های نعنا (*Mentha aquatic* L.)، علف‌شیر (*Echinophora sibthorpiana* Guss.)، زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) و کاکوتی (*Ziziphora persica* Bunge) و عصاره‌های سیر، اسپند (*Peganum harmala* L.) و داتوره (*Datura stramonium* L.) دارای بیش‌ترین تأثیر ضد باکتریایی بودند. اثر عصاره‌های کلروفرمی، اتانولی و هگزانی شیرمرغ (*Ornithogalum cuspidatum* Bertol.)، فراسیون (*Marrubium vulgarel* L.) و متامتی (*Hypericum androsaemum* L.) روی *X. translucens* به روش نشت از دیسک بررسی و بیش‌ترین تأثیر به عصاره‌ی اتانولی شیرمرغ با قطر هاله بازدارنده ۱۳/۵ میلی‌متر نسبت داده شد. عصاره‌های هگزانی اثر ضد باکتریایی نداشتند که نشان می‌دهد نوع حلال در استخراج متابولیت‌های ثانویه فعال گیاه موثر است (Habibi Gharakhili et al., 2014). با توجه به این‌که تهیه عصاره آبی ساده بوده و نیاز به تجهیزات خاصی ندارد و بنابراین درصورت موثر بودن، کاربرد آن‌ها برای همگان امکان‌پذیر است؛ تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی چند گیاه دارویی بر روی دو باکتری *X. citri* subsp. *Citri* و *X. translucens* انجام گرفت. تاکنون تأثیر عصاره‌های گیاهی در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط *in vivo* مورد بررسی قرار نگرفته است و تمام گزارش‌های موجود برمبنای بررسی‌های آزمایشگاهی بوده است؛ بنابراین در تحقیق حاضر بر اساس نتایج آزمایشگاهی دو عصاره انتخاب و تأثیر آن‌ها در کنترل این بیماری در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه جدایه‌های باکتریایی

باکتری مولد لکه نواری گندم (*X. translucens*) از مرکز تحقیقات کشاورزی کرج تهیه شد. جهت تهیه باکتری مولد شانکر مرکبات، از باغات کرمان نمونه‌هایی از بافت‌های (شاخه، میوه و برگ) لیموترش دارای علائم شانکر برداشت شد و جداسازی و خالص‌سازی باکتری طبق روش‌های معمول انجام شد. به طور خلاصه قطعاتی از مرز بافت سالم و آلوده جدا و بعد از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و شست‌وشو با آب مقطر سترون، حتی المقدور ریز و به مقداری آب مقطر سترون منتقل شدند. بعد از گذشت حدود بیست دقیقه یک یا دوقطره از سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت آگار غذایی به روش مخطط کشت و بعد از ظهورپرگنه‌ها، خالص‌سازی انجام شد (Schaad et al., 2001).

### شناسایی جدایه‌ها

جهت تأیید شناسایی باکتری جداشده از برگ گندم دارای علائم لکه نواری که از مرکز تحقیقات کرج تهیه شده بود؛ چند آزمون فنوتیپی مهم شامل گرم، اکسیداز، رشد درشرایط هوازی و بی‌هوازی، کاتالاز، لهاندن ورقه های سیب‌زمینی، واکنش فوق حساسیت و لوان (Schaad et al., 2001) و آزمون بیماری‌زایی انجام شد. همچنین بخشی از قطعه 16s rDNA با استفاده از جفت آغازگر 27F/1492R (Islam et al., 2016) تکثیر و جهت تعیین ترادف به شرکت کدون ژنتیک ارسال شد. سپس با مقایسه ترادف خوانش رفت و برگشت ترادف برآیند تعیین و با برنامه BLAST[1] با ترادف‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (http://www.ncbi.nlmnih.gov) مقایسه شد. جهت بررسی فیلوژنتیکی چند ترادف مشابه از بانک ژن NCBI دریافت و درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار Mega10.2.2 به روش Neighbor joining رسم شد. شناسایی جدایه‌های مولد شانکر مرکبات نیز بر مبنای ردیابی با جفت آغازگر اختصاصی Xac01/02 (Coletta-Filho et al., 2006) و آزمون بیماری‌زایی انجام گرفت. ترادف آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است.

### آزمون بیماری‌زایی

آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه مولد لکه نواری گندم، با پاشش سوسپانسیون کشت تازه باکتری به گیاهچه‌های سه برگی گندم (حدود دو هفته پس از کاشت) انجام شد. گلدان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در زیر پوشش پلاستیکی و پس از آن تا زمان ظهور علائم در شرایط گرم (تقریبا ۲۶ درجه سلسیوس) و مرطوب نگه‌داری شدند. در مورد جدایه مولد شانکر مرکبات، آزمون بیماری‌زایی به روش سوزن‌زنی[2] انجام گرفت. به این منظور سوسپانسیون کشت تازه باکتری روی بافت (برگ و شاخه) لیموترش قرار داده شد و در محل قرارگذاری قطره چندین زخم با سوزن ایجاد شد. گلدان‌های مایه‌زنی شده در گلخانه نگه‌داری و تا یک ماه بعد از نظر بروز علائم بررسی شدند. لازم به ذکر است، مایه‌زنی نمونه‌های شاهد با آب مقطر سترون انجام شد. در مورد هر دو باکتری پس از بروز علائم، جداسازی مجدد و شناسایی عامل بیماری انجام گرفت.

**جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر**

**Table1. Primers used in this study**

| Primer | Sequence (5'→3') | References |
|---|---|---|
| 27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | Islam et al., 2016 |
| 1492R | GGTTACCTTGTTACGACTT | Islam et al., 2016 |
| Xac01 | CGCCATCCCCACCACCACCACGAC | Coletta-Filho et al., 2006 |
| XAc02 | AACCgCTCAATgCCATCCACTTCA | Coletta-Filho et al., 2006 |

1- Basic Local Alignment Search Tool

2- Pin prick

## تهیه عصاره گیاهی

بخش‌های هوایی پنج گیاه بومادران (*Achillea millefolium* L.)، سیر (*Allium sativum* L.)، چز (*Teucrium polium* L.)، مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) و گل‌اروانه (*Hymenocrater longiflorus* Benth.) در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۷ از شهر شهرکرد جمع آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در جریان ملایم آب شست و شو و در سایه و در دمای محیط خشک شدند. سپس با استفاده از مخلوط-کن خانگی پودر و از الک ۵۰ مش عبور داده شدند. برای تهیه عصاره آبی ۱۰ گرم پودر هر گیاه به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد و به مدت سه روز روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سوسپانسیون حاصله پس از عبور از پارچه، به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی در دمای ۴۵ درجه سلسیوس تغلیظ و با عبور از فیلتر کاغذی ۰/۴۵ میکرون سترون شد. مقدار ماده خشک در هر میلی‌لیتر از هر عصاره تعیین شد. به این منظور، ابتدا سه عدد لوله آزمایش تمیز جداگانه وزن و به هرکدام یک میلی‌لیتر عصاره اضافه و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شد تا عصاره‌ها خشک شود. لوله‌ها مجدد وزن شدند. وزن لوله حاوی عصاره خشک شده از وزن لوله خالی کسر شد. میانگین سه تکرار به عنوان مقدار ماده خشک در هر میلی‌لیتر درنظرگرفته شد (Goudarzi et al., 2006).

## بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهی

بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی با روش نشت در آگار در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم ماده خشک در هر چاهک انجام شد. به این منظور، با درنظرگرفتن غلظت هر عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، یکسان‌سازی غلظت عصاره‌ها در دو سطح ۳۳/۳۳ و ۶۶/۶۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به ترتیب جهت تأمین ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم ماده‌ی خشک در چاهک، انجام گرفت. محیط کشت آگار مغذی[1] تهیه و به میزان مساوی (تقریباً ۱۳ میلی‌لیتر) در تشتک‌های پتری شش سانتی‌متری توزیع شد. از کشت تازه هر باکتری، سوسپانسیونی در آب مقطر سترون تهیه شد و جذب نوری آن معادل ۰/۳ در ۶۰۰ نانومتر تنظیم شد. صد میکرولیتر از سوسپانسیون به سطح محیط کشت منتقل و با میله L شکل، به طور یکنواخت روی تمامی سطح پخش شد. پس از خشک شدن سطح محیط، با استفاده از کورک‌بورر، یک چاهک به قطر شش میلی‌متر در مرکز هر پتری ایجاد و ۳۰۰ میکرولیتر از هر عصاره در چاهک ریخته شد (Balouiri et al., 2016). از آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد. هم‌چنین جهت مقایسه تأثیر دیسک کاغذی آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم در دیسک) نیز مورد بررسی قرار گرفت. محیط‌های کشت پس از تخلیه چاهک‌ها و نشت عصاره در آگار به دمای ۲۸ درجه سلسیوس منتقل شدند و بعد از ۴۸ ساعت قطر هاله بازدارنده از رشد اندازه‌گیری شد. این آزمایش به‌صورت اسپلیت پلات-فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. در پایان داده‌ها بوسیله نرم‌افزار آماری SAS, 9.1.3 تجزیه شدند. برای انجام آزمون تجزیه واریانس، آزمون نرمال بودن داده‌ها (آزمون کولموگروواسمیرنو) روی داده‌ها صورت گرفت. جهت انجام مقایسات میانگین برهم‌کنش گونه باکتری×نوع عصاره×غلظت عصاره، از روش برش‌دهی و به‌منظور مقایسه میانگین اثرات ساده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد استفاده شد.

## تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی از روش سری رقت لوله‌ای استفاده شد. در مورد هر باکتری، ابتدا از عصاره‌های گیاهی منتخب (عصاره‌هایی که در آزمون بررسی اثر ضد باکتریایی به روش نشت از چاهک بیش‌ترین قطر هاله بازدارنده از رشد را تشکیل داده بودند) در محیط کشت مایع مغذی[2] سری رقت در حجم‌های دو میلی‌لیتری

1- Nutrient Agar

2- Nutrient Broth

تهیه شد. سپس به هر لوله آزمایش ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه باکتری ($OD_{600}$=۰/۳) اضافه شد. لوله‌ی حاوی محیط‌کشت خالص (بدون عصاره) تلقیح شده با باکتری به عنوان شاهد مثبت و لوله‌ی حاوی مخلوط عصاره و محیط‌کشت بدون باکتری به عنوان شاهد منفی استفاده شدند. درنهایت لوله‌ها به دمای ۲۸ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، لوله‌ها با مقایسه با لوله‌ی شاهد منفی از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. کم‌ترین رقت از عصاره که در آن کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی از محتویات لوله‌هایی که در آن‌ها کدری مشاهده نشده بود، پس از یکنواخت‌سازی ۵۰۰ میکرولیتر در سطح محیط کشت پخش و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. کم‌ترین رقتی از عصاره که از کشت محتویات آن هیچ کلونی ظاهر نشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی درنظر گرفته شد. در مورد هر باکتری آزمایش در دو تکرار انجام شد (Mohammadi-Sichani et al., 2011).

## عصاره‌گیری جهت ارزیابی تأثیر عصاره‌های گیاهی در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط گلخانه

از پودر خشک دو گیاه منتخب سوسپانسیون پنج درصد در آب مقطر تهیه شد. این سوسپانسیون به مدت نیم ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس نگه‌داری و به مدت سه روز روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. عصاره‌ی حاصل از عبور سوسپانسیون از پارچه صافی در اجرای آزمایش به کار برده شد.

## ارزیابی تأثیر عصاره‌های گیاهی در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط گلخانه

بذور گندم رقم بک‌کراس در گلدان‌های پلاستیکی سه کیلوگرمی کشت شد. بعد از جوانه‌زنی در هر گلدان ۱۰ بوته حفظ و بوته‌های اضافی حذف شدند. وقتی بوته‌ها به مرحله شش برگی رسیدند، مایه‌زنی باکتری انجام گرفت. به این منظور از کشت تازه باکتری *X. translucense* سوسپانسیونی با جذب نوری ۰/۳ در ۶۰۰ نانومتر تهیه و به روش اسپری کردن مایه‌زنی شد. برای هر گلدان ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون استفاده شد به طوری‌که بوته‌ها به طور کامل خیس شدند. عصاره‌های گیاهی در دو زمان ۲۴ ساعت قبل و ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی به میزان ۲۰ میلی‌لیتر روی بوته‌ها اسپری شدند. از محلول ۲۰ درصد (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اکسی‌تتراسیکلین هیدروکلراید و آب مقطر به ترتیب به عنوان شاهد مثبت و منفی استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه با میانگین دمای ۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگه‌داری شدند. دوهفته بعد از مایه‌زنی، بوته‌ها از نظر ظهور علائم و شدت علائم ارزیابی شدند. در هر تکرار درصد وقوع بیماری در بوته‌ها و برگ‌ها با شمارش بوته‌ها و برگ‌های بیمار و سالم و با تقسیم تعداد بوته یا برگ بیمار به تعداد کل بوته یا برگ تعیین شد. برای محاسبه شدت بیماری در هر تکرار (گلدان)، از میان برگ‌های بیمار، به طور تصادفی ده برگ انتخاب و با مقایسه با کلید مصور نمره‌دهی Duveiller (1994) شدت بیماری هر برگ تعیین شد. میانگین شدت بیماری در این ده برگ به عنوان شدت بیماری هر تکرار ثبت شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی در پنج تکرار اجرا شد. تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS, 9.1.3 انجام گرفت. مقایسه میانگین با آزمون LSD و در سطح پنج درصد انجام شد.

# نتایج

## شناسایی جدایه‌های باکتری

جدایه باکتری مولد لکه نواری گندم، گرم منفی و هوازی اجباری بود. واکنش این جدایه در آزمون‌های کاتالاز، لوان و فوق حساسیت در شمعدانی (HR) مثبت و در آزمون‌های اکسیداز، تولید رنگ‌دانه فلورسنت، هیدرولیز نشاسته و لهاندن ورقه‌های سیب‌زمینی منفی بود. مقایسه ترادف قطعه 16s rDNA این جدایه با ترادف‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد این ترادف بیش‌ترین تشابه (۹۹/۹۳ درصد) را با ترادف

باکتری *X. translucens* pv. *undulosa* با شماره‌های دسترسی CP043540.1 و CP042500.1 دارد. ترادف مذکور با شماره‌دسترسی MZ325442 در بانک ژن NCBI ثبت شد. با دریافت چندین ترادف مشابه از سویه‌های مختلف، درخت فیلوژنتیکی رسم شد (شکل ۱) که بیان‌گر قرابت این جدایه با جدایه‌های ثبت شده به عنوان *X. translucens* است. این جدایه در آزمون بیماری‌زایی سبب بروز علائم مشخص بیماری لکه نواری گندم شد. علائم بیماری در ابتدا به‌صورت لکه‌های آب‌سوخته ظاهر شد که به تدریج در طول برگ‌ها و در حد فاصل رگبرگ‌ها توسعه پیدا کرد (شکل ۲- A). در جداسازی مجدد از بافت‌های دارای علائم، همان جدایه مایه‌زنی شده جدا شد. براساس ویژگی‌های فنوتیپی، ترادف 16s rDNA و آزمون بیماری‌زایی این جدایه به عنوان *X. translucens* شناسایی شد.

سویه‌های جدا شده از بافت‌های دارای علائم شانکر مرکبات، گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و هوازی اجباری بودند. دارای پرگنه زرد کرم رنگ بودند و روی محیط King's B رنگ‌دانه فلورسنت ایجاد نکردند. این جدایه‌ها در آزمون PCR با جفت‌آغازگر Xac01/Xac02 که انواع سویه‌های *Xcc* را ردیابی می‌کند (Coletta–Filho et al., 2006)؛ قطعه مورد انتظار (۵۸۱ جفت‌بازی) را تکثیر نمودند (شکل ۳) و بنابراین به عنوان *Xcc* شناسایی شدند. مایه‌زنی این سویه‌ها روی برگ لیموترش علائم تیپیک شانکر یعنی لکه‌های برجسته آتشفشانی با هاله‌ی زرد رنگ ایجاد کردند (شکل ۲- B). اولین علائم بیماری یعنی رشد بافت کالوز ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی پدیدار شد. مایه‌زنی روی شاخه نیز سبب بروز لکه‌های برجسته شانکر شد (شکل ۲- C). جداسازی مجدد عامل بیماری نیز با موفقیت انجام گرفت.

**شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی ایجاد شده به روش Neighbor joining بر اساس ترادف بخشی از ناحیه 16s rDNA جدایه‌های باکتری *Xanthomonas translucens* . اعداد نزدیک محل انشعاب هر شاخه میزان آزمون اعتبارسنجی از ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. جدایه مورد استفاده در تحقیق حاضر با شماره دسترسی MZ325442 مشخص شده است.**

**Figure 1. Phylogenetic distance tree constructed by neighbor-joining method, comparing 16S rDNA sequences of *Xanthomonas translucens* isolates. Bootstrap values are shown as percentages of 100 replicates at the branch point. MZ325442 indicates the isolate used in this study.**

**شکل ۲- نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی. A: علائم آب‌سوختگی حاصل از مایه‌زنی مصنوعی *X. translucens* روی برگ گندم یک هفته بعد از مایه‌زنی؛ B و C: ظهور علائم تیپیک بیماری شانکر مرکبات در اثر مایه‌زنی *X. citri* sub sp. *citri* روی برگ (B) و شاخه لیموترش (C). پیکان محل مایه زنی شاهد (آب مقطر) را نشان می‌دهد.**

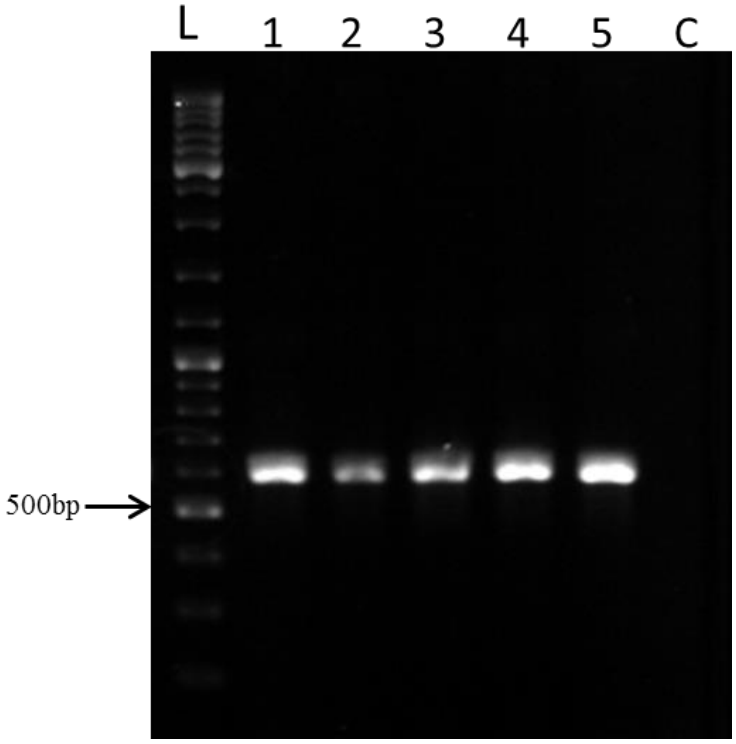
**Figure 2. The results of pathogenicity tests- A: Water-soaking symptoms induced by artificial inoculation of *X. translucens* on wheat one week after inoculation- B and C: Typical symptoms of canker obtained by inoculation of *X. citri* sub sp. *citri* on the leaf (B) and twig (C) of Mexican lime. The arrow key shows inoculation site of negative control (distilled water).**

## اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به سنجش قدرت بازدارندگی عصاره‌های گیاهی از دو باکتری بیمارگر مورد بررسی، بیان‌گر معنی‌دار بودن اثر نوع عصاره و غلظت آن، اثر متقابل آن‌ها، اثر متقابل هرکدام با گونه و اثر متقابل سه‌گانه گونه×عصاره×غلظت در سطح احتمال یک درصد است (جدول ۲). مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده از رشد (جدول ۳) نشان داد که عصاره‌های آبی چهار گیاه گل‌اروانه، بومادران، سیر و چز روی هر دو باکتری مورد بررسی به درجات مختلف خاصیت ضد باکتریایی داشتند. عصاره‌ی مریم‌گلی روی هیچ

کدام از باکتری‌های مورد بررسی اثر بازدارنده از رشد نداشت و در هر دو باکتری قطر هاله بازدارنده حاصل از آن با آب مقطر تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). بیش‌ترین اثر بازدارندگی از رشد *X. translucens* مربوط به عصاره گل‌اروانه با قطر هاله بازدارنده از رشد ۰/۲۴±۳/۱۴ و ۰/۳۱±۲/۵۳ سانتی‌متر به ترتیب در غلظت ۲۰ و ۱۰ میلی‌گرم بود. در رتبه بعدی عصاره گیاه بومادران قرار داشت که قطر هاله بازدارنده آن در غلظت ۱۰ و ۲۰ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و با غلظت ۱۰ گیاه گل‌اروانه نداشت ($P>0.05$). حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ی بومادران برای این باکتری به ترتیب ۱/۸۷۵ و ۷/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر و درمورد عصاره گل‌اروانه به ترتیب ۳/۱۲۵ و ۶/۲۵ تعیین شد که نشان دهنده توان ضد باکتریایی قابل توجه این عصاره‌ها است.

در مورد باکتری *X. citri* بیش‌ترین اثر بازدارندگی از رشد مربوط به عصاره چز و گل‌اروانه در غلظت ۲۰ میلی‌گرم به ترتیب با قطر هاله بازدارندگی ۰/۱۳± ۲/۵ و ۰/۰۵± ۲/۲ سانتی‌متر بود که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($P>0.05$). البته در غلظت ۱۰ قدرت بازدارندگی عصاره چز بیش‌تر از گل‌اروانه بود($P<0.05$). حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی هر دو عصاره‌ی چز و گل‌اروانه برای این باکتری به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.




**شکل ۳- تکثیر قطعه‌ی تقریبا ۵۸۰ جفت‌بازی در آزمون PCR با جفت‌آغازگر Xac01/02 (Coletta-Filho et al., 2006) از باکتری‌های جدا شده از بافت‌های دارای علائم شانکر درخت لیموترش- L: نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی DNA– 5-1: جدایه‌های باکتریایی- C: شاهد (آب مقطر)**

**Figure 3. Amplification of 580 bps fragment in PCR using Xac01/02 primers (Coletta-Filho et al., 2006) from bacterial strains isolated from symptomatic tissues of Mexican lime- L: 100 bps DNA ladder- 1-5: bacterial solates- C: negative control(distilled water)**

**جدول۲- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی قدرت مهارکنندگی چند عصاره گیاهی از رشد دو گونه‌ی باکتری بیمارگر گیاهی (*Xanthomonas citri* sub sp. *citri* و *X. translucens*)**

**Table 2. Analysis of variance of data resulted from an assessment of biocontrol activity of some plant extracts on two plant pathogenic bacteria (*Xanthomonas citri* sub sp. *citri* and *X. translucens*)**

| Source of variations | df | Mean squared |
|---|---|---|
| Species | 1 | 0.897ns |
| r* species | 2 | 0.27 ns |
| Plant Extract | 4 | 2.59** |
| Concentration | 3 | 12.688** |
| Plant Extract * Species | 4 | 3.369** |
| Concentration * Species | 3 | 20.047** |
| Plant Extract * Concentration | 12 | 1.069** |
| Plant Extract * Concentration * Species | 12 | 2.286** |
| Error | 78 | 0.235 |
| Cv | 4.700 | |

ns: no significant, **: significant at 1% level

**جدول ۳- مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده از رشد حاصل از چند عصاره گیاهی در دو غلظت۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم ماده موثره علیه دو گونه باکتری در مقایسه با گروه‌های شاهد منفی (آب مقطر) و شاهد مثبت (تتراسیکلین ۳۰ میکروگرم)**

**Table 3. Mean comparison of growth inhibitory zone diameter obtained by some plant extracts at two concentrations (10 and 20 mg of active ingredients) against two bacterial species compared to positive (Tetracycline 30µg) and negative (distilled water) controls**

| No. | Plant extracts | Concentration (mg) | Means of inhibition zone (cm) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Xanthomonas translucens* | | *Xanthomonas citri* | |
| 1 | Tetracycline | 0.03 | 3.50 | A | 3.00 | A |
| 2 | *Achillea millefolium* | 10 | 2.67 | C | 1.07 | E |
| | | 20 | 2.37 | C | 1.77 | C |
| 3 | *Hymenocrater longiflorus* | 10 | 2.53 | C | 1.20 | DE |
| | | 20 | 3.14 | B | 2.20 | B |
| 4 | *Allium sativum* | 10 | 1.33 | E | 1.47 | CD |
| | | 20 | 1.73 | D | 1.68 | C |
| 5 | *Teucrium polium* | 10 | 1.00 | F | 1.70 | C |
| | | 20 | 1.40 | E | 2.50 | B |
| 6 | *Salvia officinalis* | 10 | 0.73 | Fg | 0.75 | F |
| | | 20 | 0.73 | Fg | 0.62 | F |
| 7 | Distilled water | - | 0.60 | G | 0.60 | F |

Means with same letter in each column are non-significantly different (LSD test, 5% level)

براساس جدول مقایسه میانگین اثر متقابل عصاره و گونه روی قطر هاله بازدارنده از رشد (جدول ۴)، اثر بازدارندگی عصاره بومادران و گل‌اروانه روی *X. translucens* بیش‌تر از *X. citri* است درحالی‌که عصاره چز روی *X. citri* اثر بازدارندگی بیش‌تری دارد ($P<0.05$). اثر بازدارندگی عصاره‌های سیر و مریم‌گلی روی دو باکتری مورد بررسی اختلاف معنی‌دار ندارد ($P>0.05$).

## ارزیابی تأثیر عصاره‌های‌گیاهی در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط گلخانه

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به بررسی تأثیر عصاره‌های‌گیاهی در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط گلخانه (جدول ۵) بیان‌گر تاثیر معنی‌دار ($P<0.01$) کاربرد عصاره بر درصد وقوع بیماری و درصد شدت بیماری است. با این حال تأثیر زمان کاربرد عصاره‌ها قبل یا بعد

ازمایه‌زنی معنی‌دار نبود ($P>0.05$). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد عصاره‌های بومادران و گل‌اروانه در مقایسه با شاهد منفی باعث کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) درصد شدت بیماری و درصد وقوع بیماری در برگ شده است (جدول ۶). تأثیر عصاره گل‌اروانه بر درصد وقوع بیماری در بوته معنی‌دار نبود ($P>0.05$). نکته قابل توجه این که تأثیر عصاره بومادران در کاهش هر سه صفت مورد بررسی به طورمعنی‌داری ($P<0.05$) بیش‌تر از تیمار محلول اکسی‌تتراسیکلین بود. این عصاره در مقایسه با شاهد منفی (آب مقطر) باعث کاهش شدت بیماری از ۴۲ درصد به ۴/۷ درصد شد. تأثیر عصاره گل‌اروانه در کاهش درصد وقوع بیماری در بوته و درصد شدت بیماری به طور معنی‌دار ($P<0.05$) کم‌تر از بومادران بود ولی با محلول اکسی‌تتراسیکلین اختلاف معنی‌دار نداشت. درصد شدت بیماری تحت تأثیر این عصاره در مقایسه با شاهد منفی ۲۷ درصد کاهش یافته بود.

**جدول ٤- مقایسه میانگین اثر متقابل عصاره × گونه روی قطر هاله بازدارنده از رشد دو باکتری**

**Table 4. Mean comparison of the interaction effect of plant extract×species on growth inhibitory zone diameter against two bacterial species**

| No. | Plant extracts | Means of inhibition zone (cm) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Xanthomonas translucens* | | *Xanthomonas citri* | |
| 1 | *Achillea millefolium* | 2.28 | b | 1.61 | e |
| 2 | *Hymenocrater longiflorus* | 2.44 | a | 1.75 | de |
| 3 | *Allium sativum* | 1.78 | d | 1.69 | de |
| 4 | *Teucrium polium* | 1.61 | e | 1.95 | c |
| 5 | *Salvia officinalis* | 1.38 | f | 1.24 | f |

Means with the same letter are not significantly different (LSD test, 5% level)

**جدول ٥- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی تاثیر کاربرد عصاره‌های آبی گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) و گل‌اروانه (*Hymenocrater longiflorus*) بر درصد وقوع و شدت بیماری لکه نواری باکتریایی گندم حاصل از باکتری *Xanthomonas translucens* در مقایسه با شاهد منفی (آب) و شاهد مثبت (تتراسیکلین)**

**Table 5. Analysis of variance of data resulted from an assessment of the effect of applying the aqueous extracts of yarrow (*Achillea millefolium*) and gol-e-arvaneh (*Hymenocrater longiflorus*) on diseases incidence and diseases severity of wheat bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas translucens* compared with negative (distilled water) and positive (Tetracycline) control groups**

| Source of variations | Df | Mean squared | | |
|---|---|---|---|---|
| | | DIP[a] | DIL [b] | DS [c] |
| Block | 3 | 47.08 | 1.127 | 0.74 |
| Extract | 3 | 1204** | 12.07** | 26.6** |
| Time | 1 | 60.5 [ns] | 1.36[ns] | 0.09[ns] |
| Extract*Time | 3 | 400.75 [ns] | 0.633[ns] | 0.39[ns] |
| Error | 21 | 149.774 | 1.061 | 0.58 |
| CV | | 19.69 | 13.43 | 19.6 |

ns: no significant, **: significant at 1% level; a: diseases incidence in plants; b: diseases incidence in leaves; c: diseases severity

**جدول ٦- مقایسه میانگین اثر کاربرد عصاره‌های آبی بومادران (*Achillea millefolium*) و گل‌اروانه (*Hymenocrater longiflorus*) بر کنترل بیماری لکه نواری گندم حاصل از *Xanthomonas translucens* در مقایسه با شاهد منفی (آب) و شاهد مثبت (تتراسیکلین).**

**Table 6. Mean comparison of the effect of applying aqueous extracts of yarrow (*Achillea millefolium*) and gol-e-arvaneh (*Hymenocrater longiflorus*) on control of wheat bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas translucens* compared with negative (distilled water) and positive (Tetracycline) control groups.**

| No. | Extracts | Diseases Incidence in Plants (%) | Diseases Incidence in Leaves (%) | Diseases Severity [a] (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | *Achillea millefolium* | 45.5c | 39.875b | 4.725c |
| 2 | *Hymenocrater longiflorus* | 67.375ab | 51.125b | 14.9b |
| 3 | Tetracycline | 61.375b | 70a | 11.4b |
| 4 | Distilled water | 74.25a | 82.37a | 42.025a |

In each column, means with same letter are not significantly different (LSD test, 5% level); a: Diseases severity was assessed using pictorial disease assessment key proposed by Duveiller (1994).

## بحث

امروزه آگاهی از تهدیدات زیست‌محیطی ناشی از استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی و نیز مساله افزایش بروز مقاومت به آفت‌کش‌ها سبب ترغیب محققین به یافتن آفت‌کش‌های جدید به خصوص آفت‌کش‌های زیستی شده است تا کاربرد آن‌ها برای انسان و محیط زیست ایمن باشد. گیاهان و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها منابع مهمی برای ایجاد آفت‌کش‌های جدید هستند (Pino et al., 2013). در تحقیق حاضر، ابتدا در شرایط آزمایشگاهی اثر ضد باکتریایی عصاره چند گیاه دارویی در جلوگیری از رشد دو بیمارگر گیاهی مهم، مولد بیماری‌های لکه نواری گندم و شانکر مرکبات، بررسی شد و سپس تأثیر عصاره‌های منتخب در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

عصاره آبی گل‌اروانه در شرایط آزمایشگاه رشد هر دو باکتری مورد بررسی را مهار نمود و در شرایط گلخانه نیز در مقایسه با شاهد باعث کاهش معنی‌دار شدت بیماری لکه نواری گندم شد. این عصاره روی دو باکتری *Ewingella americana* و *Pseudomonas tolaasii* نیز اثر مهارکنندگی قابل توجهی داشته است (Nourbakhsh Shourabi et al., 2020). اثر ضد میکروبی گونه‌های مختلف این جنس در چندین مطالعه دیگر نیز بررسی و تأیید شده است (Bazzaz and Harirzadeh 2003; Zaidi and Crow 2005; Ahmadi et al., 2010). فلاونوئیدها، اسید فنولیک و ترپنوئیدها از ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده این گیاه هستند (Morteza-semnani et al., 2016). عصاره بومادران نیز در شرایط آزمایشگاه در بازداری از رشد هر دو بیمارگر مورد بررسی موفق عمل کرد؛ البته اثر بازدارندگی آن روی *X. translucens* بیش‌تر بود، به طوری‌که حداقل غلظت بازدارنده آن ۱/۸۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. در شرایط گلخانه نیز کارایی عصاره بومادران در کاهش درصد وقوع و درصد شدت بیماری لکه نواری گندم قابل توجه و بیش‌تر از محلول تتراسیکلین و گل اروانه بود. لازم به ذکر است بر اساس گزارش‌های موجود، اسانس این گیاه قدرت چندانی در بازداری از رشد *X. translucens* نشان نداده است (Beyki and Alizadeh, 2006) که بیان‌گر تفاوت ترکیبات ضد میکروبی موجود در اسانس و عصاره است. گونه‌های جنس *Achillea* از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی به شمار می‌آیند که هم در طب سنتی و هم به‌منظور داروسازی استفاده شده‌اند. در مطالعات مختلف اثر ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های گونه‌های مختلف بومادران نسبت به چندین بیمارگر مختلف مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است

Candan et al., 2003; Stojanovic et al., 2005; Ahmadi et al., 2011; Mohammadi-Sichani et al., 2011). این گیاهان دارای انواع ترکیبات دارویی از قبیل ترپن‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک، کومارین‌ها و استرول‌ها هستند (Saeidnia et al., 2011). توانایی عصاره آبی بومادران و گل‌اروانه در کنترل رشد *Pseudomonas tolaasii* در شرایط آزمایشگاهی و نیز تاثیر آن‌ها در پیش‌گیری از بروز بیماری لکه‌باکتریایی قارچ خوراکی در شرایط مزرعه‌ای (*in vivo*) موفقیت‌آمیز گزارش شده است (Nourbakhsh Shourabi et al., 2020). با توجه به موارد مذکور از تحقیقات قبلی و نتایج مطالعه حاضر در کاربرد موفق این دو عصاره در کنترل بیماری لکه نواری در شرایط گلخانه، به نظر می‌رسد گل‌اروانه و بومادران گزینه‌های مناسبی برای بررسی‌های بیش‌تر و مطالعه جهت سنتز ترکیبات زیستی ضد باکتریایی باشند.

در تحقیق حاضر عصاره گیاه چز موثرترین عصاره در بازداری از رشد *X. citri* بود ولی توان آن در بازدارندگی از *X. translucens* کم‌تر از بومادران و گل‌اروانه بود. گیاه چز نیز یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که در طب سنتی ایران استفاده می‌شود. گروه‌های مختلفی از ترکیبات شیمیایی در این گیاه تشخیص داده شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها فلاونوئیدها و ترپنوئیدها هستند. این ترکیبات خواص ضد باکتریایی و ضدقارچی دارند (Bahramikia and Yazdanparast, 2012). اثر عصاره آبی این گیاه در رشد چندین بیمارگر باکتریایی و قارچی انسان مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج این عصاره دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل توجه بوده است (Mosadegh et al., 2002). عصاره الکلی و متانولی این گیاه روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زای انسانی موثر بوده است (Darabpour et al., 2010).

عصاره سیر بر روی هر دو باکتری خاصیت بازدارندگی نشان داد؛ البته اثر بازدارندگی آن روی هر دو باکتری در رتبه سوم قرار داشت. با افزایش غلظت عصاره در چاهک قطر هاله بازدارنده افزایش یافت. در یک گزارش، با بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ی آبی اکالیپتوس، پیاز، سیر، چریش، شیشم و زیتون تلخ علیه *X. citri*، عصاره‌ی سیر و چریش به عنوان موثرترین ترکیبات معرفی شده‌اند (Tahir et al., 2016). عصاره‌ی آبی سیر روی *X. translucens* نیز به عنوان یکی از موثرترین عصاره‌ها گزارش شده است (Beyki and Alizadeh, 2006).

عصاره گیاه مریم‌گلی روی هیچ کدام از باکتری‌های مورد بررسی اثر ضد باکتریایی نشان نداد؛ به‌طوری‌که در هر دو مورد قطر هاله بازدارنده با شاهد (آب مقطر) تفاوت معنی‌دار نداشت درحالیکه بر طبق گزارشات قبلی، گیاه مریم‌گلی تاحدودی توانایی بازداری از رشد *X. transluncens* را دارد (Beyki and Alizadeh, 2006).

در مورد اثر بازدارندگی سایر عصاره‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر روی دو باکتری مورد بررسی گزارشی وجود ندارد و لذا امکان مقایسه نتایج وجود ندارد. در این‌جا ذکر این نکته ضروری است که از آن جایی که روش استاندارد و مشخصی برای تهیه عصاره وجود ندارد و معمولا هر محقق برای عصاره‌گیری از غلظت و شیوه‌ی دلخواه استفاده می‌کند؛ مقایسه نتایج آزمایشگاهی بدون درنظر گرفتن روش عصاره‌گیری و غلظت عصاره و نیز روش مورد استفاده در بررسی خاصیت ضد میکروبی صحیح نیست. به طور مثال در هر دو باکتری مورد بررسی، قطر هاله بازدارنده از رشد ایجاد شده توسط عصاره سیر در مطالعات قبلی بیش‌تر از قطر ثبت شده در مطالعه حاضر می‌باشد که به نظر می‌رسد مربوط به اختلاف غلظت اولیه عصاره باشد. در بررسی تاثیر عصاره سیر روی *X. citri* عصاره اولیه از طریق له کردن ۷۵ گرم بافتهای گیاهی تازه در ۲۵ میلی‌لیتر آب (غلظت ۷۵٪) و صاف کردن مخلوط تهیه شده است (Tahir et al., 2016) و در بررسی تأثیر عصاره روی

*X. translucens* عصاره‌گیری با خرد کردن ۱۰ گرم بافت گیاهی در ۲۰ میلی‌لیتر آب (غلظت ۵۰٪) و تکان دادن مخلوط به مدت ۴۸ ساعت و سپس صاف کردن و تغلیظ محلول حاصل انجام گرفته‌است (Beyki and Alizadeh, 2006) که هر دو متفاوت از روش عصاره‌گیری تحقیق حاضر می‌باشند. از طرفی این موضوع نیز نباید نادیده گرفته شود که مقدار مواد ضد میکروبی موجود در گیاهان بسته به شرایط رشد و مرحله رشدی گیاه متفاوت است (Gillitzer et al., 2012) که می تواند ناهمخوانی نتایج آزمایش‌های مختلف را توجیه کند. همچنین روش بررسی اثر بازدارندگی نیز روی قطر هاله بازدارنده تاثیر دارد. معمولا روش نشت از آگار نسبت به روش نشت از دیسک کاغذی حساسیت بیش‌تری دارد چون ممکن است رسوب مواد نامحلول در آب در دیسک کاغذ مانع از نشت ترکیبات در آگار شود (Valgas et al., 2007). گروه‌های هیدروکسیل آزاد گلوگز باعث آب دوست شدن سطح کاغذ می‌شوند (Burgess et al., 1999)؛ بنابراین اگر ترکیبات بارگذاری شده روی دیسک کاتیونی باشند به سطح دیسک متصل می‌شوند و نشت نمی‌کنند. از طرفی در آزمون بررسی خاصیت ضد میکروبی به روش نشت از آگار نیز ضخامت محیط کشت در قطر هاله بازدارنده تأثیر دارد؛ چون درصورت نازک بودن محیط کشت ماده ضد میکروبی در سطح بیش‌تری پخش می‌شود. بنابراین در مطالعات مقایسه‌ای این نکته باید مورد توجه قرار گیرد. در تحقیق حاضر نیز مقدار مساوی محیط کشت در پتری‌ها توزیع شد تا ضخامت محیط یکسان باشد و خطای آزمایش به حداقل برسد.

شدت بازدارندگی متفاوت بعضی از عصاره‌های گیاهی مورد بررسی مانند گل‌اروانه، بومادران و چز روی دو گونه بیمارگر از جنس *Xanthomonas* نشان می‌دهد که کارایی عصاره‌ها در کنترل باکتری می‌تواند بسته به گونه باکتری متفاوت باشد. بنابراین برای معرفی یک عصاره یا ترکیب گیاهی به عنوان ترکیب ضد میکروبی برای هر بیمارگر انجام آزمایش‌های غربال‌گری و تعیین غلظت مناسب ضروری است. گزارش‌های متعددی از اثر متفاوت عصاره‌ها روی گونه های مختلف یک جنس وجود دارد که می‌توان به مواردی از قبیل تاثیر متفاوت چندین اسانس گیاهی روی گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس (Silva et al., 2013) و تأثیر متفاوت عصاره‌ی چند گونه سیانوباکتری روی دو گونه فوزاریوم (Safari et al., 2015) اشاره نمود. با توجه به اینکه *X. citri* و *X. translucens* روی میزبان‌های متفاوت چوبی و علفی سازش یافته‌اند، قطعا از نظر گیرنده‌های غشا و دیواره سلولی و غیره تفاوت‌هایی دارند که ممکن است باعث تفاوت در میزان جذب عصاره‌ها و یا حساسیت به عصاره‌ها شوند. تاکنون تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین این دو باکتری انجام نشده است ولی بررسی مقایسه‌ای ژنومی انجام شده بین دو باکتری *X. citri* subsp. *citri* و *X. arboricola* pv. *pruni* بیان‌گر وجود تفاوت در پروتئین‌های دریافت کننده سیگنال‌های محیطی (سنسورهای سیستم تنظیم کننده دو جزئی)، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، افکتورهای سیستم ترشحی نوع سوم و پروتئین‌های ضمائم دخیل در حرکت و اتصال به سطح می‌باشد (Garita-Cambronero et al., 2019) که وجود چنین تفاوت‌هایی بین *X. citri* و *X. translucens* نیز دور از انتظار نیست.

در تحقیق حاضر علی‌رغم این‌که در شرایط آزمایشگاهی تأثیر بازدارندگی تتراسیکلین روی *X. translucens* بیش‌تر از عصاره‌های گیاهی بود ولی در شرایط گلخانه اثر آن در کاهش درصد وقوع و شدت بیماری کم‌تر از بومادران بود. در توجیه این نتیجه باید این نکته ذکر شود که ترکیبات ضد میکروبی گیاهی علاوه بر اثر بازدارندگی از رشد می‌توانند با سازوکارهای مختلف ازجمله بازداری از تشکیل بیوفیلم، کاهش نسخه‌برداری از ژنهای لازم برای اتصال، کاهش تولید

توکسین، کاهش تولید کپسول و تولید ترکیبات ضد احساس حدنصاب (anti-quorum sensing) باعث کاهش بیماری‌زایی باکتری‌ها شوند (Upadhyay et al., 2014). بنابراین ممکن است کاهش شدت بیماری رابطه مستقیم با درصد بازدارندگی از رشد نداشته باشد. ناپایداری آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح گیاه نیز می تواند این نتیجه را توجیه کند. آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است تا یک ماه بعد از مصرف روی سطح گیاه با روش‌های شیمیایی حساس ردیابی شوند ولی توانایی آنها در جلوگیری از رشد باکتری ظرف مدت یک هفته از دست می‌رود (Stockwell and Duffy, 2012). در یک تحقیق پایداری اکسی‌تتراسیکلین روی درختان هلو بررسی شده است. براساس این گزارش غلظت اکسی‌تتراسیکلین در هوای آفتابی بعد از دو روز، در هوای ابری بعد از چهار روز و در بارندگی شدید بعد از دو دقیقه برای جلوگیری از باکتری *X. arboricola* pv. *pruni* کافی نیست (Christiano, 2010).

در پایان ذکر این مطلب ضروری است که در سنتز ترکیبات آفت‌کش طبیعی اولین قدم بررسی خاصیت ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی است ولی در مرحله بعد انجام آزمایش‌ها *in vivo*، جهت بررسی توانایی ترکیب زیستی برای مقابله و مهار بیمارگر در محیط طبیعی ضروری است. در تحقیق حاضر برای اولین بار تاثیر عصاره‌های آبی گیاهان بومادران و گل اروانه در کنترل بیماری لکه نواری گندم در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت که هر دو عصاره در این زمینه کارا بودند. همچنین مشخص شد گل‌اروانه و چز روی باکتری مولد شانکر آسیایی مرکبات اثر مهارکنندگی دارد. بنابراین این عصاره‌ها گزینه‌های مناسبی برای بررسی‌های بیش‌تر به‌منظور سنتز ترکیبات ضد باکتریایی ایمن هستند. لازم است در زمینه تاثیر روی سویه‌های بیش‌تر و با منشا متفاوت، تأثیر روی میکروارگانیسم‌های مفید، میزان دوام و پایداری ترکیب در طبیعت و نحوه‌ی فرمولاسیون مطالعاتی انجام گیرد.

## سپاس‌گزاری

از دانشگاه شهرکرد به علت تأمین بودجه لازم برای انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

## REFERENCES

Ahmadi, F., Sadeghi, S., Modarresi, M., Abiri, R., and Mikaeli, A. 2010. Chemical composition, *in vitro* anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. Food and Chemical Toxicology, 48: 1137-1144.

Ahmadi, Z., Sattari, M., Tabaraee, B., and Bigdeli, M. 2011. Identification of the constituents of *Achillea santolina* essential oil and evaluation of the anti-microbial effects of its extract and essential oil. Arak Medical University Journal, 14(56): 1-10 (In Farsi with English Abstract).

Amiri Henzaei, S., Hossinipour, A., Masoumi, H., and Azadvar, M. 2018. Investigating the effect of ajowan and Welsh onion against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the causal agent of Asiatic citrus canker. The International Conference on Agricultural Science, Medicinal Plants and Traditional Medicine, Mashhad, Iran (In Farsi). https://civilica.com/doc/740267

Bahramikia, S., and Yazdanparast, R. 2012. Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). Phytotrapy Research, 26(11): 1581-1593.

Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S.K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2): 71-9.

Bazzaz, B.S., and Haririzadeh, G. 2003. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharmaceutical Biology, 41: 573-583.

Beiki, F., and Alizadeh, A. 2006. Antibacterial effects of some herbal essential oils and plant extracts on the causal agent of bacterial leaf streak in wheat and barley. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 13 (5): 70-82 (In Farsi with English Abstract).

Burgess, J.G., Jordan, E.M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., and Boyd, K.G. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. Journal of Biotechnology, 70: 27-32.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. et al. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, 87(2-3): 215-220.

Cavoski, I., Caboni, P., and Miano, T. 2011. Natural pesticides and future perspectives. In Stoytcheva, M. (Ed.). Pesticides in the Modern World-Pesticides Use and Management. IntechOpen. pp. 169-190.

Christiano, R.S.C., Reilly, C.C., Miller, W.P., and Scherm, H. 2010. Oxytetracycline dynamics on peach leaves in relation to temperature, sunlight, and simulated rain. Plant Disease, 94: 1213-1218.

Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., de Souza, A.A., Neto, J.R., Destéfano, S.A.L. et al. 2006. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. Journal of Applied Microbiology, 100: 279-285

Copping, L.G. 2009. The Manual of Biocontrol Agents (formerly the Biopesticide Manual) 4th Edition. British Crop Production Council (BCPC), Farnham, Surrey UK.

Darabpour, E., Motamedi, H., and Seyyed Nejad, S.M. 2010. Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3(2): 124-127.

Duveiller, E. 1994. A pictorial series of disease assessment keys for bacterial leaf streak of cereals. Plant Disease, 78(2): 137-141.

Duveiller, E., Bragard, C., and Maraite, H. 1997. Bacterial leaf streak and black chaff caused by *Xanthomonas translucens.* In Duveiller, E., Fucikovskil, L., & Rudolph, K. (Eds.). The Bacterial Disease of Wheat: Concept and Methods of Disease Management. CIMMYT. pp. 25-32.

Forster, R.L., and Schaad, N.W. 1988. Control of black chaff of wheat with seed treatment and a foundation seed health program. Plant Disease, 72(11): 935-938.

Gadhe, S.K., Dale, N.S., Umbarkar, R.B., Antre, S.H., Labade, G.B. et al. 2016. *In vitro* inhibitory activity of crude extracts of plants against citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. International Journal of Current Research, 8(9): 38533-38537.

Gillitzer, P., Martin, C., Kantar, M., Kauppi, K., Dahlberg, S. et al. 2012. Optimization of screening of native and naturalized plants from Minnesota for antibacterial activity. Journal of Medicinal Plants Research, 6(6): 938-949.

Goudarzi, M., Sattari, M., Najar piraieh, S., Goudarzi, G., and Bigdeli, M. 2006. Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts of Thyme on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Yafteh, 8(3): 63-69 (In Farsi).

Habibi Gharakhili, A., Nematzadeh, Gh.A., and Alavi, S.M. 2014. Study on antibacterial effect of some plant extracts for control of bacterial leaf streak of wheat. The First Conference of Medicinal Plants, Traditional Medicine and Organic Agriculture. Hamedan Iran (In Farsi). https://civilica.com/doc/330014/.

Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T., and Hossain, M.M**.** 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. Frontiers in Microbiology, 6: 1-12.

Kumar, J.; Ramlal, A.; Mallick, D.; and Mishra, V.2021. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. Plants, 10: 1185. https://doi.org/10.3390/plants10061185

Lamichhane, J.R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J.B. et al. 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. Agronomy for Sustainable Development, 38. DOI: 10.1007/s13593-018-0503-9.

Mohammadi-Sichani, M., Amjad, L., and Mohammadi-Kamalabadi, M. 2011. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of *Achillea wilhelmsii* against pathogenic bacteria. Zahedan Journal of Research in Medical Science (ZJRMS), 13(3): 9-14 (In Farsi).

Morteza-Semnani, K., Ahadi, H., Hashemi, Z. 2016. The genus *Hymenocrater*: a comprehensive review. Pharmaceutical Biology, 54(12): 3156-3163.

Mosadegh, M., Dehmoubed Sharifabadi, A., Nasiri, P., Esmaeili, S., and Naghibi, F. 2002. The study of phytochemical, antifungal and antibacterial effects of *Teucrium polium* and *Cichourium intybus*. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 7: 1-6 (In Farsi with English Abstract).

Nourbakhsh Shourabi, S.F., Yousefi Kopaei, F., Mohammadi Eshkaftaki, R. 2020. Screening of plant extracts for antibacterial activity against *Pseudomonas tolaasii* and *Ewingella*

*americana*, the bacterial pathogens of cultivated button mushroom. Journal of Crop Protection, 9(3): 367-380.

Saeidnia, S., Gohari, A.R., Mokhber-Dezfuli, N., and Kiuchi, F. 2011. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 19(3): 173-186.

Safary, M., Ahmady-Asbchin, S. 2015. *In vitro* assessment of antimicrobial activity from aqueous and methanolic extracts of some species of cyanobacteria. Biological Journal of Microorganism, 4(14): 111-130 (In Farsi with English Abstract).

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA.

Silva, A., Santana, E., Saraiva, A., Coutinho, F., Castro, R. et al. 2013. Which Approach Is More Effective in the Selection of Plants with Antimicrobial Activity? Evidence-based complementary and alternative medicine, 2013: Article ID 308980. https://doi.org/10.1155/2013/308980.

Silva, I.T., Rodrigues, F.A., Oliveira, J.R., Pereira, S.C., Andrade, C.C.L. et al. 2010. Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. Journal of Phytopathology, 158: 253-262.

Stockwell, V.O. and Duffy, B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties, 31 (1): 199-210

Stojanovic, G., Radulovic, N., Hashimoto, T., and Palic, R. 2005. *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species. The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. Journal of Ethnopharmacology, 101:185-190.

Tahir, H.A.S., Sahi, Sh.T., Habib, A., Haq, I.U., Ahmad, A., and Ashraf, W. 2016. Evaluation of plant extracts as biocontrol agents against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* the cause of citrus canker. Pakistan Journal of Phytopathology, 28(1): 35-43.

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A. and Venkitanarayanan K. 2014. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. BioMed Research International, Article ID: 761741. DOI: 10.1155/2014/761741.

Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E.F.A. and Smânia, A.Jr. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology, 38: 369-380.

Vauterin, L., Yang, P., Hoste, B., Pot, B., Swings, J., Kersters, K. 1992. Taxonomy of Xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. Journal of General Microbiology, 138: 1467-1477.

Villamizar, S., and Caicedo, J. 2019. Biological control of citrus canker: new approach for disease control. In Topolovec-Pintarić, S. (ed.) Plant diseases - Current threats and management trends. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.88000.

Zaidi, M.A., and Crow, S.A.Jr. 2005. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan. Journal of Ethnopharmacology, 96: 331-334.

© 2021 Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International. (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

# The effect of aqueous extract of some medicinal plants against *Xanthomonas translucens* and *X. citri* subsp. *citri in vitro* and their effect on the control of bacterial leaf streak of wheat under greenhouse conditions

A. Roshani[1] and F. Yousefi Kopaei[2*]

1. M.Sc. Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran (yousefi@sku.ac.ir)

(DOI): 10.22055/ppr.2021.16943

Received: 23 February 2021 Accepted: 12 July 2021

## Abstract

### Background and Objectives

Bacterial leaf streak of wheat caused by *Xanthomonas translucens* and Asiatic citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* are two important bacterial diseases that cause considerable damage in Iran. Copper compounds are usually applied to control these diseases. However, their phytotoxicity and development of copper-resistant bacterial strains have made to develop new antimicrobial compounds indispensable. On the other hand, because of awareness of the chemical pesticides' threats to the environment and human health, biopesticides were considered. Hence, this study aimed to identify plant extracts that effectively control these two bacteria.

### Materials and Methods

Identifying bacterial isolates was accomplished based on phenotypic, molecular and pathogenicity tests. In the first step, the effect of aqueous extract of five medicinal plants was examined against *X. translucens* and *X. citri* sub sp. *citri in vitro* using the agar well diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by serial dilution method. Then, according to the results of laboratory experiments, two extracts were chosen, and their effect was assessed on the control of wheat bacterial leaf streak under greenhouse conditions.

### Results

In the laboratory tests, measuring growth inhibitory zone diameter showed that the extracts of gol-e-arvaneh (*Hymenocrater longiflorus* Benth), yarrow (*Achillea millefolium* L.), garlic (*Allium sativum* L.) and *Teucrium polium* L. have different degrees of significant antibacterial effect on both examined bacteria. The extract of sage (*Salvia officinalis* L.) had no inhibitory effect on both bacteria. The extracts of gol-e-arvaneh and yarrow had the highest antibacterial activity against *X. translucens* with the inhibitory zone of 31 and 24 mm, respectively. In the case of *X. citri*, the extracts of *T. polium* and gol-e-arvaneh had the highest antibacterial activity with the inhibitory zone of 25 and 22 mm, respectively. In the greenhouse experiments, applying the extracts of yarrow and gol-e-arvaneh to control wheat leaf streak led to remarkable reduction of disease incidence and disease severity percent.

### Discussion

According to the laboratory experiments, the intensity of the inhibitory effect of extracts varied based on the bacterial species. Therefore, to produce a plant extract as an antimicrobial agent against a bacterial pathogen, the performance of screening tests is unavoidable. The affectivity of

the extracts of yarrow and gol-e-arvaneh for controlling *X. translucens* in laboratory and greenhouse conditions showed that these two extracts are suitable candidates for further investigation, to synthesis safe antibacterial compounds for the management of wheat bacterial leaf streak.

***Keywords: Growth inhibition, Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration***