Sciences Journal of Vegetables **دو فصلنامه علمی- پژوهشی علوم سبزی‌ها**
Vol 4, No 8, Autumn & Winter 2021, Pages (161-175) سال ۴- شماره ۸- پاییز و زمستان ۱۳۹۹- صفحات (۱۷۵-۱۶۱)
DOI: 10.22034/IUVS.2021.523995.1145

اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها و ترکیبات مونوترپنی علیه بیماری باکتریایی لکه قهوه‌ای قارچ تکمه‌ای

مهدی اخلاقی[1*]، علیرضا برجسته[2]، محمدرضا عالی‌منش[3]، احمد اخیانی[4] و احمد دزیانیان[2]
۱- دانش‌آموخته دکتری بیماری شناسی گیاهی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران
۲- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۴- استادیار بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران
* نویسنده مسئول: M.akhlaghi66@yahoo.com
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰)

چکیده

باکتری *Pseudomonas tolaasii* یکی از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زای قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) در ایران و جهان محسوب می‌شود. این تحقیق در سال ۱۳۹۹ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود) انجام پذیرفت و مقایسه شدت بیماری‌زایی ۱۰ جدایه مختلف با نام‌های Pt۱، Pt۲، Pt۳، Pt۴، Pt۵، Pt۶، Pt۷، Pt۸، Pt۹ و Pt۱۰ مشخص نمود جدایه Pt۴ بیشترین میزان بیماری‌زایی را دارا بود. همچنین اثر ضد باکتریایی اسانس گیاهان آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، ریحان (*Ocimum basilicum*)، اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، زنیان (*Trachyspermum ammi*)، باریجه (*Ferula gummosa*)، بومادران (*Achillea eriophora*)، جعفری (*Petroselinum sativum*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، و گل ماهور (*Verbascum songaricum*) علیه جدایه Pt۴ به روش انتشار دیسک سنجیده شد. بر اساس قطر هاله بازدارنده، به‌ترتیب اسانس‌های ریحان و آویشن شیرازی دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بودند. نتایج تجزیه شیمیایی کروماتوگرافی گازی مشخص نمود متیل کاویکول با ۶۷/۰۵ درصد بیشترین ترکیب مونوترپنی اسانس ریحان را تشکیل می‌داد که همراه با دو ترکیب شناخته شده آویشن شیرازی شامل کارواکرول و تیمول اثر کنترل‌کنندگی مناسبی علیه باکتری *P. tolaasii* داشتند. بهترین اثر در کنترل بیماری بر روی کلاهک قارچ در حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به‌ترتیب برای تیمول، کارواکرول و متیل کاویکول به‌دست آمد؛ اما در برخی غلظت‌های بالاتر از MIC، تیمول و کارواکرول بروز علائم سیاه‌شدگی در کلاهک را سبب شدند. متیل کاویکول علی‌رغم اثر کمتر روی کاهش بیماری‌زایی تقریباً هیچ اثر سوئی روی بافت قارچ نداشت؛ بنابراین استفاده از ترکیب متیل کاویکول می‌تواند گزینه مناسبی جهت جلوگیری از بیماری لکه قهوه‌ای قارچ تکمه‌ای در سالن‌های پروش قارچ تکمه‌ای باشد.

واژه‌های کلیدی: تیمول، سودوموناس تولاسی، کارواکرول، متیل کاویکول.

مقدمه

قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) از نظر باغبانی جزء سبزی‌هایی با میزان پروتئین و ارزش غذایی بالا محسوب می‌شود (Shahriari *et al*., 2018). قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید بیشترین سطح زیر کشت قارچ خوراکی در ایران را به خود اختصاص داده است (Farsi & Pourianfar, 2011). قارچ خوراکی همواره تحت تأثیر بیماری‌هایی است که در زمان رشد و پس از برداشت سبب ایجاد خسارت می‌شوند (Gea *et al*., 2005). قارچ خوراکی تکمه‌ای به تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها حساس می‌باشد و یکی از مهمترین باکتری‌های بیمارگر آن، باکتری *Pseudomonas tolaasii* است. باکتری‌های جنس *Pseudomonas* یک تاکسون از باکتری‌ها را با متابولیت‌های متنوع تشکیل می‌دهند که در محیط‌های آبی و خاکی روی گیاهان، حیوانات، انسان و قارچ‌ها ایجاد بیماری می‌کنند (Palleroni, 1993). اگرچه برخی گونه‌های سودوموناس‌ها باعث خسارت اقتصادی در قارچ‌های خوراکی می‌گردند؛ اما ۱۰ درصد کل باکتری‌ها در کمپوست و گاهی تا ۵۰ درصد باکتری‌های خاک‌پوششی را جنس *Pseudomonas* تشکیل می‌دهد (Godfrey *et al*., 2001a). علاوه بر قارچ *A. bisporus* گونه‌های دیگری نظیر *A. campestris*، *Pleurotus ostreatus* و *P. eryngii* توسط باکتری‌های سودوموناس متحمل خسارت می‌شوند (Munsch *et al*., 2002). در بین گونه‌های سودوموناس، *P. tolaasii* یکی از خطرناک‌ترین گونه‌ها برای *Agaricus* spp. است که عامل بیماری لکه قهوه‌ای می‌باشد (Cantore & Iacobellis, 2004). در بررسی‌های انجام شده در کشور اسپانیا میزان خسارت این باکتری در سالن‌های کشت و پرورش قارچ خوراکی تکمه‌ای تا ۱۵ درصد کل محصول تولیدی برآورد شده است (Navarro *et al*., 2018). این بیماری باعث ایجاد زخم‌های قهوه‌ای تیره و فرورفته در کلاهک یا ساقه قارچ می‌شود که محصول را غیرقابل بازاریابی می‌نماید. گاهی این باکتری‌ها به شکل اپیدمی در آمده و می‌توانند از یک کشت به کشت دیگر گسترش و انتشار پیدا کنند (Sivanesan, 2003).

کلرین و فرمالین دو ترکیب معمول ضدعفونی‌کننده در سالن‌های کشت قارچ هستند. این ترکیبات علاوه بر هزینه بالا به‌خاطر باقیمانده‌های مضری که در محصولات کشت شده بر جای می‌گذارند، مشکل‌زا هستند. بسیاری از ترکیبات شیمیایی که اجازه استفاده علیه بیماری‌های قارچ خوراکی را دارند با معضل بروز مقاومت بیمارگرها همراه هستند (Gea *et al*., 2005). برخی از ترکیبات به‌دست آمده از گیاهان شامل عصاره‌ها و اسانس‌ها توانسته‌اند بیماری‌های موجود در گیاهان و قارچ‌های خوراکی کنترل کنند (Sokovic & Van Griensven, 2006; Todorovic *et al*., 2016). در پژوهشی با بررسی ۱۰ اسانس گیاهی و ۱۰ ترکیب شیمیایی تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی بر روی عوامل بیماری‌زای قارچ خوراکی تکمه‌ای مشخص گردید، اسانس گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) بهترین اثر را در کنترل باکتری *P. tolaasii* و عوامل بیماری‌زای قارچی مانند *Trichoderma harzianum* از خود نشان داد، ضمناً ترکیب مونوترپنی کارواکرول بهترین اثر در کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی از خود بروز داد (Sokovic & Van Griensven, 2006). همچنین در پژوهشی مشخص گردید که اسانس دارچین (*Cinnamomum verum* L.) و میخک (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill) پروتئین‌های غشاء بیرونی باکتری‌های سودوموناس را تحت تأثیر قرار می‌دهد که در ادامه توانایی چسبندگی و بیماری‌زایی را در این باکتری مختل

می‌شود (Felso *et al.*, 2013). اسانس‌ها دامنه وسیعی از فعالیت‌های زیستی را دارند از جمله دارای ترکیبات فعال زیاد و متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که از طریق مکانیسم‌های متنوعی قادر به تأثیرگذاری روی باکتری‌ها می‌باشند. متابولیت‌های ثانویه گیاهان علاوه بر جذب موجودات گرده‌افشان در مقابله با آفات و بیماری‌های گیاهی و دفاع شیمیایی نیز مؤثر هستند (Burt 2004).

هدف از این تحقیق بررسی برخی ترکیبات طبیعی با منشأ گیاهی است که بتوان بدون نگرانی از اثرات سوء آن‌ها برای سلامتی و محیط‌زیست، جهت کنترل بیماری لکه قهوه‌ای باکتریایی قارچ خوراکی از آن‌ها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

جدایه های باکتریایی و شرایط کشت

جدایه‌های باکتری *P. tolaasii* به تعداد ۱۰ عدد (به‌نام‌های Pt۱ تا Pt۱۰) از آزمایشگاه بیماری‌شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی استان سمنان (شاهرود) و دانشگاه علوم پزشکی زنجان تهیه گردیدند. از محیط کینگ بی (King B) برای کشت جدایه‌ها استفاده شد (King *et al.*, 1954). جهت تهیه کشت تازه جدایه‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه باکتری (که در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند) به دو میلی‌لیتر محیط کشت لوریا-براتنی مایع (LB؛ لیوفلیکم، ترآمو، ایتالیا ۲۵ گرم در لیتر) انتقال داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه شیکر- انکوباتور قرار گرفت تا جدایه‌ها رشد نمایند. پس از رشد هر جدایه، به‌صورت چمنی بر روی محیط کشت Nutrient Agar (NA) کشت داده شدند و جهت ادامه آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (Godfrey *et al.*, 2001b).

تعیین بیماری‌زاترین جدایه

جهت آزمون بیماری‌زایی از کلاهک‌های سالم و یک دست قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) که فاقد علایم بیماری و آفات بودند استفاده شد. کلاهک‌های مورد نظر درون یک ظرف سترون که در کف آن دو عدد کاغذ صافی واتمن (شماره چهار) بود، قرار گرفتند. برای تأمین رطوبت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون بر روی کاغذ صافی ریخته شد. سپس از سوسپانسیون 10^8 CFU mL^{-1} کشت تازه هر یک از جدایه‌ها، مقدار ۳۰ میکرولیتر بر روی مرکز کلاهک قارچ قرار داده شد و درب ظرف به‌وسیله پارافیلم مسدود گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چهار تا پنج روز نگهداری شدند. تغییر رنگ و ظهور علائم آلودگی از طریق سیستم درجه‌بندی، شامل درجه یک (شدید)، درجه دو (متوسط)، درجه سه (ضعیف) و درجه چهار (بدون علائم) تعیین گردید (Akhlaghi *et al.*, 2016).

تهیه مواد گیاهی

پس از تهیه گیاهان از مراکز معتبر تجاری یا رویشگاه‌های طبیعی فرآیند شناسایی توسط متخصصین باغبانی انجام پذیرفت. شست‌وشوی سطحی بافت‌های گیاهی توسط آب مقطر سترون انجام و گیاهان در شرایط استاندارد (دمای اتاق و سایه) خشک شدند. برای تهیه اسانس از بخش‌های مختلف گیاهان به شرح جدول ۱ استفاده شد.

فرآیند اسانس‌گیری

بافت‌های گیاهی خشک شده به‌وسیله دستگاه آسیاب، به‌صورت پودر کامل در آمدند و ۱۰۰ گرم از پودر در مخزن دستگاه کلونجر یک لیتری قرار داده شده و ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون درون مخزن شیشه‌ای (بالن) ریخته شده و به‌مدت چهار ساعت عمل اسانس‌گیری انجام گردید. در پایان برای آبگیری اسانس، پودر سولفات سدیم (Na_2SO_4) به اسانس‌ها اضافه گردید. اسانس‌های به‌دست آمده برای انجام آزمون‌های مختلف از جمله آزمون ضد

باکتریایی و طیف‌سنجی ترکیبات، در شیشه‌های تیره (دو میلی‌لیتری) و درب بسته، در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Amini *et al*., 2016).

بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها به روش انتشار دیسک

بیماری‌زاترین جدایه باکتری *P. tolaasii* در محیط کشت LB مایع در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت رشد داده شد. در ادامه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت 10^8 CFU/mL در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller-Hinton Agar 22 gr L^{-1}) ساخت شرکت کیولَب (مونترال، کانادا) به‌صورت یکنواخت پخش شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه که سطح محیط خشک گردید، بر روی سطح محیط کشت‌ها دیسک‌هایی به قطر شش میلی‌متر (شرکت طب آزما) حاوی مقادیر ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اسانس‌های مورد آزمایش، قرار داده شد. برای شاهد منفی آزمایش از محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) یک درصد استفاده شد (Sokovic & Van Griensven, 2006).

جدول ۱- مشخصات گیاهان استفاده شده جهت تهیه اسانس

ردیف	نام گیاه	نام علمی	خانواده	بافت مورد استفاده	استان محل جمع‌آوری
۱	آویشن شیرازی	*Zataria multiflora*	Lamiaceae	برگ	فارس
۲	رزماری	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	برگ	سمنان
۳	ریحان	*Ocimum basilicum*	Lamiaceae	برگ و شاخه	سمنان
۴	اسطوخودوس	*Lavandula angustifolia*	Lamiaceae	برگ	فارس
۵	رازیانه	*Foeniculum vulgare*	Apiaceae	برگ و شاخه	فارس
۶	باریجه	*Ferula gummosa boiss*	Apiaceae	برگ و شاخه	فارس
۷	زنیان	*Trachyspermum ammi*	Apiaceae	بذر	سمنان
۸	جعفری	*Petroselinum sativum*	Apiaceae	بذر	سمنان
۹	بومادران شیرازی	*Achillea eriophora*	Asteraceae	برگ	سمنان
۱۰	گل ماهور	*Verbascum songaricum*	Scrophulariaceae	برگ	سمنان

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس‌ها

آزمایش MIC در میکروپلیت ۹۶ خانه سترون (در حجم ۲۵۰ میکرولیتر) حاوی محیط کشت مایع و با روش رقیق‌سازی در میکروپلیت (Microdilution broth) انجام شد. ابتدا از محیط کشت مولر هینتون مایع، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس مورد بررسی (که در حلال DMSO یک درصد حل شده بود) اضافه گردید و پس از چند بار مخلوط کردن از چاهک اول به دوم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و هر چاهک به‌میزان دو برابر چاهک بعدی رقیق گردید و این کار برای ۱۰ چاهک تکرار شد. در آخر به همه چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت 10^8CFU mL^{-1} اضافه گردید و میکروپلیت‌ها برای ۱۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر ۹۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. چاهک شماره ۱۱ هر ردیف فقط حاوی محیط کشت، DMSO و اسانس بود (شاهد منفی) و چاهک شماره ۱۲ هر ردیف حاوی محیط کشت، DMSO و باکتری بود که جهت شاهد تعیین کدورت باکتری استفاده شد (کنترل

مثبت). بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت توسط جذب نوری در دستگاه خوانش‌گر الیزا (Microplates–Reader) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. کمترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد. برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی، از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت‌های MIC و بیشتر از آن) مقدار ۱۰ میکرولیتر در شرایط سترون (هود میکروبی) برداشته شد و بر روی محیط NA کشت گردید. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کمترین رقتی که توانسته ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را بکشد (عدم رشد روی محیط کشت)، به‌عنوان رقت MBC در نظر گرفته شد. همه‌ی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین ارائه گردید (Shariari *et al.*, 2018).

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌هایی با بیشترین قدرت ضد باکتریایی توسط دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC)

شناسایی اجزاء تشکیل دهنده اسانس گیاه ریحان با دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) مجهز به ستون دی بی ۵ (DB-5) با قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر با طول ستون ۵۰ سانتی‌متر ساخت کشور انگلیس انجام شد. دمای آون از ۱۲۰-۵۵، ۲۰۰-۱۲۰ و ۲۲۰-۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب با سرعت سه، چهار و شش درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. از گاز هلیوم و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از ۴۱ تا ۴۵۰ استفاده گردید. در هر مورد پس از تزریق مقادیر جزیی از اسانس، کروماتوگرام حاصله و طیف‌های جرمی ترکیبات مختلف موجود در آن مورد بررسی قرار گرفت (Sarrou *et al.*, 2013). شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی وایلی، زمان بازداری، محاسبه اندیس کواتس، مطالعه طیف‌های جرمی هر یک از اجزای اسانس و بررسی الگوهای شکست آن‌ها، مقایسه با طیف‌های استاندارد و استفاده از منابع معتبر صورت گرفت. درصد نسبی هر یک از اجزای اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC و مقایسه با سطح کل منحنی تعیین شد. در مورد گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در مطالعات قبلی نگارندگان و سایر محققین، ترکیبات توسط آنالیز GC مشخص شده بود.

تهیه ترکیبات مونوترپنی و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی

پس از بررسی ترکیبات اسانس‌هایی با بیشترین قدرت ضد باکتریایی، اجزای عمده اسانس‌ها (ترکیبات ساخته شده به‌صورت شیمیایی و موجود در لیست شرکت‌هایی تهیه مواد شیمیایی) از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شدند و در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمایش‌ها تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برای این مواد مطابق با توضیحات بخش پنج در سه تکرار انجام پذیرفت.

بررسی اثرات مضر ترکیبات منوترپنی روی قارچ خوراکی

ترکیبات منوترپنی با غلظت‌های ۱۰ برابر MIC روی کلاهک اسپری شدند تا اثرات منفی احتمالی آن‌ها روی کلاهک بررسی شوند. در این روش از اسپری‌پاشی آب مقطر سترون و کلاهک بدون اسپری‌پاشی به‌عنوان شاهد استفاده گردید. تغییرات در رنگ و بافت قارچ برای ۱۰ روز در دمای اتاق و در زمان‌های صفر، پنج و ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش با سه تکرار انجام پذیرفت (Nourbakhsh Shourabi *et al.*, 2020).

بررسی اثر ضد باکتریایی ترکیبات مونوترپنی بر روی کلاهک قارچ در شرایط آزمایشگاهی

جهت آزمون بیماری‌زایی، کلاهک‌های سالم و رشد کرده (به قطر حدود سه تا چهار سانتی‌متر) قارچ خوراکی تکمه‌ای (*A. bisporus*) به تعداد سه عدد برای هر یک از تیمارها و کنترل، به آزمایشگاه منتقل شدند. از بیماری‌زاترین جدایه یک کشت تازه تهیه شد و از سوسپانسیون 10^8 CFU mL^{-1} اسپری‌پاشی بر روی کلاهک‌های قارچ انجام گرفت تا کل سطح کلاهک آغشته گردد. برای شاهد منفی از آب مقطر سترون استفاده شد. پس از گذشت ۶۰ دقیقه و استقرار باکتری *P. tolaasii* در سطح کلاهک از غلظت‌های MIC هر سه ترکیب مونوترپنی متیل کاویکول، تیمول و کارواکرول جهت اسپری پاشی استفاده شد. برای کنترل مثبت از آب مقطر سترون استفاده شد. در ادامه ظروف حاوی کلاهک‌های قارچ ابتدا در پاکت‌های پلاستیکی قرار گرفت و سپس به ژرمیناتور (دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند. پس از گذشت هفت روز میزان پیشرفت بیماری در سطح کلاهک قارچ بررسی شد (Nourbakhsh Shourabi *et al*., 2020).

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. به‌منظور تجزیه داده‌ها برای پارامترهای مورد مطالعه از نرم‌افزار Minitab (version 15) استفاده شد. میانگین داده‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج

نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *P. tolaasii* در قارچ خوراکی

نتایج شدت بیماری‌زایی ۱۰ جدایه *P. tolaasii* در جدول ۲ نشان داده شده است. در بین جدایه‌های مورد آزمایش، حالات مختلفی از بیماری‌زایی مشاهده شد. تغییر رنگ بافت کلاهک قارچ در آزمون بیماری‌زایی برای جدایه‌های مختلف *P. tolaasii*، از رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره متغیر بود (جدول ۲). جدایه Pt۴ باعث تغییر رنگ شدید، فرورفتگی و اضمحلال بافت قارچ در مدت زمان چهار روز گردید و از لحاظ بیماری‌زای در گروه شدید قرار گرفت (شکل ۱). سایر جدایه‌ها نشانه‌های بیماری‌زایی قوی تا بدون علائم بیماری را از خود نشان دادند. جدایه Pt۴ به‌دلیل توان بیشتر بیماری‌زایی برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد (جدول ۲).

جدول ۲- مشخصات جدایه های *Pseudomonas tolaasii* مورد استفاده در آزمون تعیین شدت بیماری‌زایی

ردیف	نام جدایه	محل تهیه جدایه	شدت بیماری‌زایی
۱	Pt۱	شاهرود[a]	ضعیف
۲	Pt۲	شاهرود	ضعیف
۳	Pt۳	شاهرود	قوی
۴	Pt۴	شاهرود	شدید
۵	Pt۵	شاهرود	قوی
۶	Pt۶	شاهرود	متوسط
۷	Pt۷	شاهرود	متوسط
۸	Pt۸	زنجان[b]	ضعیف
۹	Pt۹	زنجان	متوسط
۱۰	Pt۱۰	زنجان	بدون علائم

a: مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)؛ b: دانشگاه علوم پزشکی زنجان.

شکل ۱- علائم بیماری‌زایی شدید جدایه *Pseudomonas tolaasii* (Pt۴) در کلاهک قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید

نتایج آزمون اثر ضد باکتریایی اسانس‌های مورد آزمایش به روش دیسک

اسانس‌های مورد آزمایش از خود اثرات ضد باکتریایی متفاوتی علیه جدایه Pt۴، باکتری *P. tolaasii* نشان دادند (جدول ۳). برخی از اسانس‌های مورد آزمایش مانند ریحان، آویشن شیرازی، رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و زنیان (*Foeniculum vulgare*) به‌خوبی توانستند از رشد جدایه باکتری Pt۴ جلوگیری کنند. بیشترین قطر هاله بازدارنده (۱۹ میلی‌متر) مربوط به اسانس گیاه ریحان در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و اسانس گیاهان جعفری (*Petroselinum sativum*) و باریجه (*Ferula gummosa boiss*) در همین غلظت بدون تشکیل هاله بازدارنده فاقد اثر ضد باکتریایی علیه باکتری عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی تشخیص داده شدند. نتایج این آزمون نشان داد که افزایش غلظت اسانس با افزایش قطر هاله بازدارنده رابطه‌ی مستقیم دارد و در مورد تمامی اسانس‌ها (به استثنای جعفری و باریجه) با افزایش غلظت اسانس، اثر ضد باکتریایی نیز افزایش پیدا نمود (جدول ۳). اسانس گیاه آویشن شیرازی نیز از توان ضد باکتریایی مطلوبی برخوردار بود؛ به‌طوری که در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر توانست قطر هاله بازدارنده‌ای به اندازه ۱۸/۲ میلی‌متر تشکیل دهد. اگرچه اسانس چهار گیاه بومادران شیرازی (*Achillea eriophora*)، اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و گل ماهور (*Verbascum songaricum*) در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاقد اثر ضد باکتریایی بودند اما با افزایش غلظت به ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هاله بازدارنده جزئی مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس‌های مورد آزمایش

نتایج این آزمون نشان داد که اسانس‌های مورد آزمایش دارای مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) متفاوتی بودند. بیشترین اثر بازداری از رشد در غلظت ۱/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای دو اسانس ریحان و آویشن شیرازی به‌دست آمد. کمترین اثر بازدارندگی نیز به‌ترتیب با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مربوط به اسانس‌های گل ماهور، جعفری و باریجه بود (جدول ۴). نتایج MBC نشان داد کمترین غلظت کشندگی اسانس‌های مورد آزمایش به‌ترتیب با ۳/۹ و ۷/۸۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر مربوط به دو اسانس آویشن

شیرازی و ریحان بود. همچنین اسانس گیاهان گل ماهور، جعفری و باریجه با ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کمترین اثر کشندگی را دارا بودند (جدول ۴).

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های مورد آزمایش بر قطر هاله بازدارنده باکتری *Pseudomonas tolaasii*

ردیف	نوع گیاه	غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر	
		۱۰	۲۰
		قطر هاله بازدارنده بر حسب میلی‌متر	
۱	ریحان	۱۲/۰ ± ۰/۵^{a}	۱۹/۰ ± ۱/۰^{a}
۲	آویشن شیرازی	۱۰/۱ ± ۱/۰^{b}	۱۸/۲ ± ۱/۰^{a}
۳	رازیانه	۹/۰ ± ۰/۰^{c}	۱۶/۵ ± ۰/۰^{b}
۴	زنیان	۸/۵ ± ۰/۵^{c}	۱۶ ± ۰/۰^{b}
۵	بومادران شیرازی	۰^{d}	۱۱/۵ ± ۰/۵^{c}
۶	اسطوخودوس	۰^{d}	۹ ± ۰/۵^{d}
۷	رزماری	۰^{d}	۸/۰ ± ۱/۰^{d}
۸	گل ماهور	۰^{d}	۸/۰ ± ۱/۰^{d}
۹	جعفری	۰^{d}	۰^{e}
۱۰	باریجه	۰^{d}	۰^{e}

جدول ۴- حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش علیه باکتری *Pseudomonas tolaasii*

ردیف	نوع گیاه	غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر	
		حداقل غلظت بازدارندگی	حداقل غلظت کشندگی
۱	ریحان	۱/۹	۷/۸
۲	آویشن شیرازی	۱/۹	۳/۹
۳	رازیانه	۷/۸	۱۵/۶
۴	زنیان	۷/۸	۱۵/۶
۵	بومادران شیرازی	۳۱/۵	۶۲/۵
۶	اسطوخودوس	۶۲/۵	۱۲۵/۰
۷	رزماری	۶۲/۵	۱۲۵/۰
۸	گل ماهور	۱۲۵/۰	۲۵۰/۰
۹	جعفری	۱۲۵/۰	۲۵۰/۰
۱۰	باریجه	۱۲۵/۰	۲۵۰/۰

نتایج آزمون کروماتوگرافی گازی اسانس ریحان

با توجه به اثرات ضد باکتریایی بالای اسانس ریحان آزمون تجزیه GC انجام پذیرفت. اسانس به‌دست آمده از برگ و ساقه گیاه ریحان، مایع بی‌رنگ و شفاف بود. نتایج آنالیز GC ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه ریحان مشخص نمود که در مجموع ۲۰ جزء مونوترپنی به‌دست آمده از اسانس در حدود ۹۸/۵۴ درصد از کل اجزای اسانس را تشکیل دادند و ترکیب مونوترپنی متیل کاویکول (Methyl chavicol) با ۶۷/۰۵ درصد بیشترین جزء تشکیل

دهنده اسانس گیاه ریحان بود. سایر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در جدول ۵ نشان داده شده است. بر طبق تحقیقات گذشته در مورد آویشن شیرازی دو ترکیب کارواکرول و تیمول به‌ترتیب با حدود ۵۵ و ۱۵ درصد، بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند.

جدول ۵- اجزای مونوترپنی تشکیل دهنده اسانس ریحان

شماره	نام ترکیب	درصد	شاخص بازداری (RI)
۱	2-Methyl butanol-1	۱۴/۱۹	۷۳۶
۲	α-pinene	۰/۰۹	۹۴۰
۳	sabinene	۰/۰۳	۹۶۱
۴	β-Pinene	۰/۱۲	۹۷۸
۵	p-Cymene	۰/۰۹	۱۰۳۰
۶	1,8-Cineole	۱۰/۶۷	۱۰۳۸
۷	Hyacinthin	۰/۰۱	۱۰۴۹
۸	Caprylic alcohol	۰/۱۶	۱۰۶۵
۹	Linalool oxide	۰/۰۹	۱۰۹۴
۱۰	L-Linalool	۰/۵۳	۱۱۰۶
۱۱	Fenchol	۰/۰۸	۱۱۲۱
۱۲	α-Isomenthone	۰/۰۳	۱۱۷۸
۱۳	Methyl chavicol	۶۷/۰۵	۱۱۹۶
۱۴	Anisole	۱/۸۱	۱۲۴۴
۱۵	Anisic aldehyde	۰/۵۹	۱۲۷۷
۱۶	Eugenol methyl	۱/۱۴	۱۴۱۰
۱۷	α-Bergamotene	۰/۱۲	۱۴۳۸
۱۸	Geraniol butyrate	۰/۰۲	۱۵۶۵
۱۹	(Z) β-Asarone	۱/۱۱	۱۵۹۶
۲۰	β-Caryophyllene	۰/۶۲	۱۶۱۳
۲۱	Total		-

نتایج آزمون MIC و MBC ترکیبات مونوترپنی مورد آزمایش

به‌منظور بررسی اثر مستقیم ضد میکروبی ترکیبات مونوترپنی در کنترل باکتری *P. tolaasii*، از ترکیب متیل کاویکول به‌عنوان مونوترپن غالب اسانس گیاه ریحان و دو ترکیب شیمیایی کارواکرول و تیمول (ترکیبات غالب در اسانس آویشن شیرازی) بهره گرفته شد. نتایج نشان داد که کارواکرول و تیمول در شرایط آزمایشگاهی از کارایی نسبی بیشتری در مقایسه با متیل کاویکول در کنترل باکتری *P. tolaasii* برخوردار هستند. به‌طوری‌که تیمول و کارواکرول با غلظت حداقل بازدارندگی ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدود کردن رشد باکتری از متیل کاویکول بهتر عمل نمودند (جدول ۶).

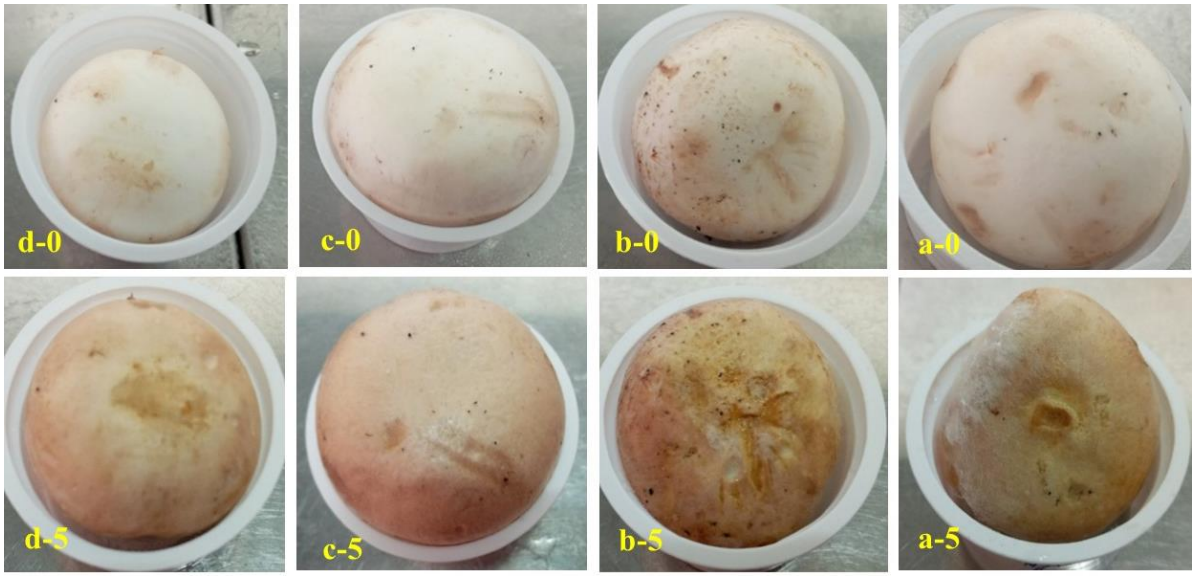
جدول ۶ - حداقل غلظت بازدارندگی و کُشندگی ترکیبات مونوترپنی مورد آزمایش علیه باکتری *Pseudomonas tolaasii*

ترکیبات	حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)	حداقل غلظت کشندگی (MBC)
متیل کاویکول	۵۰۰*	۷۵۰
کارواکرول	۲۵۰	۵۰۰
تیمول	۲۵۰	۵۰۰

- غلظت‌ها بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

بررسی اثرات ترکیبات مونوترپنی بر خصوصیات ظاهری کلاهک قارچ خوراکی

بررسی اثر ترکیبات مونوترپنی در غلظت ۱۰ برابر MIC، در مدت زمان آزمایش (پس از اعمال تیمار) نشان داد متیل کاویکول فاقد اثرات سوء بر بافت بود (شکل ۲، c-5)، در حالی‌که کارواکرول سبب تغییرات زیادی در رنگ، شکل و بافت کلاهک گردید. در واقع بیشترین اثر منفی مربوط به کارواکرول بود که باعث ایجاد تیره شدگی و تغییر شکل کلاهک شد (شکل ۲، b-5).

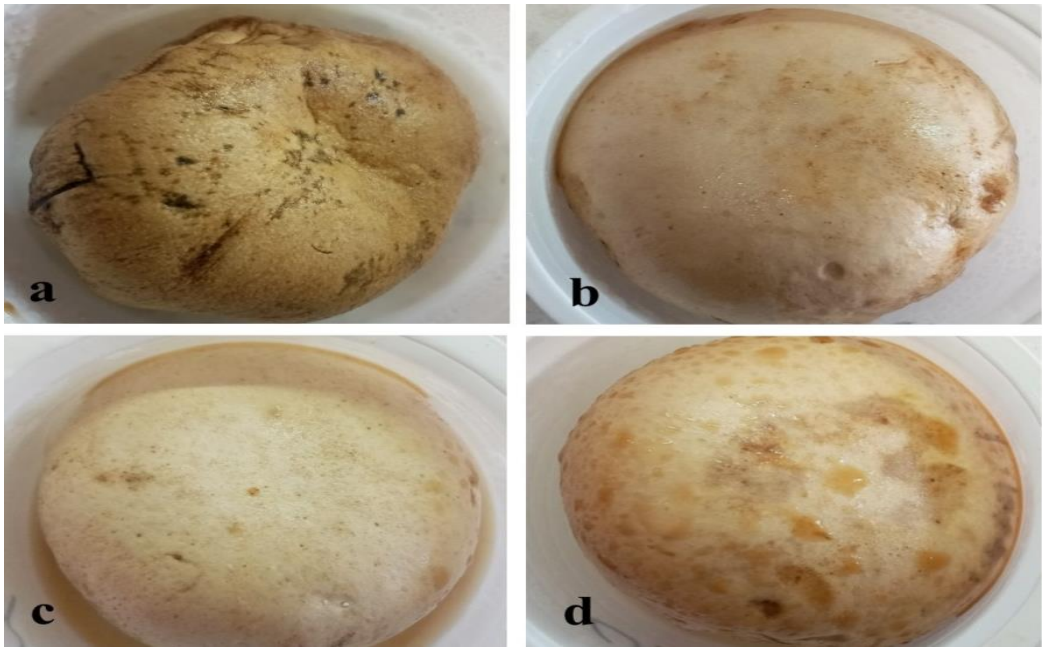


شکل ۲- تأثیر غلظت ۱۰ برابر MIC ترکیبات مونوترپنی اسپری شده به همراه شاهد بر بافت کلاهک قارچ خوراکی در زمان‌های صفر و پنج روز. a: شاهد (آب مقطر)، b: کارواکرول، c: متیل کاویکول، d: تیمول.

تیمول در همین شرایط اثر منفی کمتری را از خود نشان داد و متیل کاویکول در این غلظت تقریباً بهترین اثر را در حفظ شکل و رنگ بافت کلاهک از خود بروز داد. اگرچه هر سه ترکیب در غلظت MIC تقریباً دارای اثر ضد باکتریایی نزدیک بودند ولی با افزایش غلظت این ترکیبات، اثر منفی روی کلاهک قارچ خصوصاً برای کارواکرول افزایش یافت به‌نحوی‌که در غلظت ۱۰ برابر MIC، این ماده سبب تغییر رنگ شدید در کلاهک گردید. در مورد تیمول اثر نامناسب مشهود اما کمتر از کارواکرول بود، در صورتی‌که متیل کاویکول حتی در غلظت ۱۰ برابر MIC نیز اثرات منفی در مقایسه با شاهد نداشت.

اثر ترکیبات مونوترپنی بر جلوگیری از گسترش بیماری لکه قهوه‌ای در شرایط آزمایشگاهی

نتایج این بخش نشان داد اثرات کنترل‌کنندگی و ضد باکتریایی سه ترکیب مونوترپنی بر روی قارچ خوراکی در غلظت MIC سبب کاهش علائم پیشرفت بیماری در مقایسه با شاهد گردید. در واقع نتایج نشان داد که بیشترین اثرات کنترل‌کنندگی به‌ترتیب مربوط به کارواکرول، تیمول و متیل کاویکول است که با نتایج به‌دست آمده در مورد اثر ترکیبات مورد آزمایش بر خصوصیات ظاهری کلاهک قارچ، از اثر معکوس برخوردار بود. در حقیقت متیل کاویکول در غلظت‌های بیشتر از MIC، از توانایی بالایی در کنترل باکتری *P. tolaasii* برخوردار بود و این در حالی بود که هیچ‌گونه تغییر رنگ و بافت در سطح کلاهک قارچ خوراکی مشاهده نشد. دو ترکیب تیمول و کارواکرول در غلظت MIC (با اثرات جانبی منفی قابل چشم‌پوشی) تأثیر بهتری در کنترل بیماری ناشی از باکتری *P. tolaasii* داشتند (شکل ۳). در غلظت‌های بالاتر از MIC، اگرچه کارواکرول و تیمول رشد باکتری و علائم مختص باکتری را کاهش می‌دادند ولی با اثرات نامطلوب بر ظاهر قارچ همراه بودند.



شکل ۳- نتایج اثر باکتری *Pseudomonas tolaasii* و ترکیبات مونوترپنی اسپری پاشی شده بر کلاهک قارچ خوراکی، a: شاهد (باکتری تنها)، b: تیمول، c: کارواکرول و d: متیل کاویکول

بحث

با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان قارچ خوراکی در مورد سلامتی محصول مصرفی، استفاده از ترکیبات با منشأ طبیعی در این صنعت در سال‌های اخیر گسترش پیدا کرده است. به‌دلیل عدم وجود پوست (مانند خیلی از میوه‌ها و صیفی‌ها) در کلاهک و بافت قارچ که موجب جذب آسان و آلودگی به سموم شیمیایی می‌شود، استفاده از ترکیباتی ضد میکروبی که دارای منشأ طبیعی باشند به‌عنوان یک ضرورت، اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. در این راستا استفاده از ترکیبات ضد میکروبی مؤثر بر باکتری‌های بیماری‌زای قارچ خوراکی نظیر اسانس‌های طبیعی که حاوی مخلوطی از اجزای ترپنی و دیگر ترکیبات با خواص ضد میکروبی و عوارض جانبی کمتر (در

مقایسه با سموم شیمیایی) هستند، می‌تواند ما را در رسیدن به این هدف یاری نماید. بررسی اولیه خاصیت ضد باکتری ۱۰ اسانس گیاهی مورد بررسی در شرایط آزمایشگاهی بر ضد بیماری‌زاترین جدایه باکتری *P. tolaasii* نشان داد که علی‌رغم وجود تفاوت‌هایی بین کارایی این اسانس‌ها، برخی از این ترکیبات مانند اسانس گیاه ریحان به‌خوبی توانایی جلوگیری از رشد جدایه مورد نظر را از خود بُروز داد. اطلاعات دقیق‌تر از طریق محاسبه حداقل غلظت‌های MIC و MBC در مورد اسانس گیاه ریحان به‌دست آمد. با توجه به نتایج تحقیقات گذشته، اسانس‌های چندین گیاه دارویی بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی، خصوصاً باکتری‌های گرم منفی اثرات مثبتی داشته است (Shariari *et al*., 2018; Iacobellis *et al*., 2005). در سال‌های اخیر چندین اسانس گیاهی نتایج امیدوارکننده‌ای در کنترل گونه‌های مختلف جنس *Pseudomonas* از خود نشان داده‌اند (Shariari *et al*., 2018). نقش ضد باکتری اسانس فوق برروی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و پاتوژن‌های آلوده کننده مواد غذایی نیز به اثبات رسیده است (Avetisyan *et al*., 2017). در هر صورت لازم است تا تحقیقات بیشتری در مورد نحوه عمل اسانس فوق بر باکتری *P. tolaasii* صورت پذیرد تا با روشن شدن مکانیسم عمل ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی، به ساخت ترکیبات مؤثر ضد باکتریایی کمک نماید. در تحقیقات گذشته مشخص شده است برخی از این ترکیبات سبب غیرفعال شدن غشاء پلاسمایی و غیرفعال کردن آنزیم‌های حیاتی موجود در غشاء باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی می‌شوند (Burt, 2004). همچنین فرض بر این است که نفوذپذیری غشاء باکتری تحت تأثیر اسانس دچار اختلال می‌شود (Bajpai *et al*., 2013). گیاه ریحان (*O. basilicum*) با دارا بودن ترکیبات مهم دارویی، تغذیه‌ای و اثرات ضد باکتری از نظر گیاه‌شناسی در طب سنتی و طب جدید از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و ماده مؤثره اصلی اسانس آن متیل کاویکول تشخیص داده شده است. بر اساس تحقیقات انجام گرفته گیاه *Artemisia dracunculus* نیز دارای ترکیب عمده متیل کاویکول است که به‌نظر می‌رسد نقش ضد باکتریایی علیه *Serratia* sp و *Shigella* sp. مربوط به ترکیب فوق باشد (Sharafati Chaleshtori *et al*., 2013). با این وجود دیگر اجزای اسانس نیز در توان ضد میکروبی این گیاهان دارویی نقش دارند. توجه به این نکته ضروری است که وجود ترکیبات جزئی (Minor compounds) و اثری که با ترکیبات عمده (Major compounds) دارند در بروز خواص باکتری‌کُشی مؤثر خواهد بود. تأثیر ضد باکتریایی اندکی کمتر ترکیب متیل کاویکول نسبت به دو ترکیب دیگر (تیمول و کارواکرول) در مقایسه با تأثیر ضد باکتریایی بیشتر اسانس ریحان (شامل مجموعه‌ای از ترکیبات با درصد غالب ترکیب متیل کاویکول و برخی ترکیبات جزئی دیگر) نسبت به آویشن احتمالاً به همین خاطر باشد. علی‌رغم اینکه اسانس ریحان در بیشتر خصوصیات ضد میکروبی از اسانس آویشن بهتر بود اما متیل کاویکول وقتی به‌تنهایی به‌کار برده شد، از نظر فاکتورهای ضد باکتریایی کمی ضعیف‌تر از کارواکرول و تیمول عمل نمود؛ به‌عبارت‌دیگر ویژگی ذکر شده در اسانس ریحان به‌دلیل پدیده هم‌افزایی (synergism) ترکیبات جزئی موجود در اسانس (Minor compounds) با جزء اصلی اسانس (متیل کاویکول) بوده است که برای بررسی نقش هر یک از این ترکیبات در جلوگیری از رشد باکتری *P. tolaasii*، نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه برهمکنش ترکیبات مونوترپنی تشکیل دهنده اسانس ریحان و باکتری عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی است. در مورد اسانس گیاه آویشن و اثرات

ضد باکتریایی آن مطالعات زیادی صورت گرفته که اثر ضد باکتریایی قابل‌توجه این گیاه را اثبات نموده است (Mehran *et al*., 2015). اثرات ضد باکتریایی ترکیبات کارواکرول و تیمول نیز در تحقیقات مختلفی روی باکتری‌های مختلف تأیید شده است (Cowan, 1999; Memar *et al*., 2017).

هر چند دو ترکیب تیمول و کارواکرول اثرات ضد باکتریایی بهتری از خود نشان دادند؛ اما در غلظت‌های بالا سبب آسیب به بافت و تغییر رنگ کلاهک قارچ تکمه‌ای شدند، در حالی‌که این پدیده برای متیل‌کاویکول مشاهده نشد، لذا استفاده از متیل‌کاویکول می‌تواند در مقایسه با دیگر ترکیبات مونوترپنی مناسب‌تر باشد. از همین‌رو توجه به سایر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی در یافتن مواد مؤثر، جهت کنترل بدون عوارض بیماری لکه قهوه‌ای قارچ تکمه‌ای مهم خواهد بود. همچنین اثرات کاربرد ترکیبی این مواد (هم مواد جزئی و هم ترکیبات عمده اسانس این گیاهان) در نسبت‌های مختلف یا نسبت‌های مشابه با آنچه در گیاه است (خصوصاً در مورد ریحان) مورد کنکاش دقیق‌تری قرار گیرد تا به فرمولاسیون‌های کاربردی و اقتصادی برای کنترل بیماری‌های باکتریایی قارچ خوراکی دست پیدا کنیم.

نتیجه‌گیری

درحالی که ترکیب اصلی اسانس ریحان (متیل کاویکول) در مقایسه با دو ترکیب اصلی اسانس آویشن (تیمول و کارواکرول) از اثر ضد باکتریایی کمتری برخوردار بود؛ اما اسانس گیاه ریحان بهترین اثر را در کنترل باکتری *P. tolaasii* از خود نشان داد که به دلیل برهمکنش سایر اجزای اسانس ریحان با متیل کاویکول می‌باشد. متیل کاویکول در غلظت‌های بالا فاقد اثرات مضر در مقایسه با تیمول و کارواکرول بود و باکتری را به‌خوبی کنترل نمود که با توجه به این ویژگی می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی مورد توجه قرار گیرد.

References

- Akhlaghi, M., Tarighi, S., Farsi, M. & Taheri, P. (2016). Identification and investigation of some virulence factors of *Pseudomonas tolaasii* isolated from mushroom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51(4), 366-412. (In Farsi)
- Amini, J., Farhang, V., Javadi, T. & Nazemi, J. (2016). Antifungal effect of plant essential oils on controlling *Phytophthora* species. *Plant Pathology Journal*, 32(1), 16-32. (In Farsi)
- Avetisyan, A., Markosian, A., Petrosyan, M., Sahakyan, N., Babayan, A., Aloyan, S. & Trchounian, A. (2017). Chemical composition and some biological activities of the essential oils from basil Ocimum different cultivars. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-8.
- Bajpai, V. K., Sharma, A. & Baek, K. H. (2013). Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32(2), 582-590.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Felso, P., Horvath, G., Bencsik, T., Godanyi, R., Lemberkovics, E., Boszormenyi, A. & Kocsis, B. (2013). Detection of the antibacterial effect of essential oils on outer

membrane proteins of Pseudomonas aeruginosa by lab on a chip and MALDITOF/MS. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(6), 367-372.

- Farsi, M. & Pourianfar, H. (2011). *Cultivation and breeding of the white button mushroom* (2th ed). Jahad Daneshgahi Publications.
- Gea, F. J., Navarro, M. J. & Tello, J. C. (2005). Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese in vitro. *Mycological Resea*rch, 109(6), 741-745.
- Godfrey, S. A. C., Harrow, S. A., Marshall, J. W. & Klena, J. D. (2001a). Characterization by 16S rRNA sequence analysis of pseudomonads causing blotch disease of cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4316-4323.
- Godfrey, S. A. C., Marshall, J. W. & Klena, J. D. (2001b). Genetic characterization of Pseudomonas 'NZI7'–a novel pathogen that results in a brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 412-420.
- Iacobellis, N. S., 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(1), 57-61.
- King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307.
- Cantore, P. L. & Iacobellis, N. S. (2004). First report of brown discoloration of Agaricus bisporus caused by Pseudomonas agarici in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), 35-38.
- Mehran, M., Hossini, H., Hatami, A. R., Taghizadhe, M. & Safaaei, A. R. (2015). Evaluation of essential oil compositions of seven thyme species and comparison of their antioxidant properties. *Journal of Medicinal Plants*, 58(2), 134-140. (In Farsi)
- Memar, M. Y., Raei, P., Alizadeh, N., Aghdam, M. A. & Kafil, H. S. (2017). Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 28(2), 63-68.
- Munsch, P., Johnstone, K. & Alatossava, T. (2002). Evidence for genotypic differences between the two siderovars of Pseudomonas tolaasii, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiological Research*, 157(2), 93-102.
- Navarro, M. J., Gea, F. J. & Gonzalez, A. J. (2018). Identification, incidence and control of bacterial blotch disease in mushroom crops by management of environmental conditions. *Scientia Horticulturae*, 229, 10-18.
- Palleroni, N. J. (1993). Pseudomonas classification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3), 231-251.
- Shariari, F., Tanhaeian, A., Akhlaghi, M. & Nazifi, N. (2018). Comparison of antimicrobial activity of essential oils and plant extracts with recombinant peptide in controlling of some pathogens of cultivated white button mushrooms. *Journal of Horticultural Science*, 32(4), 615-628. (In Farsi)
- Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K. & Therios, I. (2013). Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 18(9), 10639-10647.
- Chaleshtori, R. S., Rokni, N., Razavilar, V. & Kopaei, M. R. (2013). The evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.)

essential oil and its chemical composition. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(9), 78-89.

- Sivanesan, D. (2003). *Diversity amony bacterial causing blotch disease on the commercial Mushroom Agaricus bisporus.* MSc Thesis. Brook University, Canada.
- Sokovic, M. & Van Griensven, L. J. L. D. (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.
- 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. (In Farsi)
- Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E., Stepanovic, M., Kostic, M., Ristic, M. & Milijasevic-Marcica, S. (2016.) Toxicity of twenty-two plant essential oils against pathogenic bacteria of vegetables and mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health*, 51(12), 832-839.

Antibacterial Effect of Essential Oils and Monoterpene Compounds Against Bacterial Brown Blotch Disease of White Button Mushroom

Mahdi Akhlaghi[1*], Ali Reza Barjesteh[2], Mohammad Reza Alymanesh[3], Ahmad Akhyani[4] and Ahmad Dezianian[2]

1- Ph.D. Graduate of Plant Pathology, Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran
2- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran
3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
4- Assistant Professor, Soil and Water Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran

*Corresponding author: M.akhlaghi66@yahoo.com
(Received: January. 31, 2021, Accepted: February. 28, 2021)

Abstract

Pseudomonas tolaasii is one of the most important pathogenic bacteria of the edible fungus (*Agaricus bisporus*) in Iran and the world. The present study was conducted in 2020 in the Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood) and compared the pathogenicity of 10 different isolates with the names Pt1, Pt2, Pt3, Pt4, Pt5, Pt6, Pt7, Pt8, Pt9 and Pt10 showed the highest pathogenicity was related to isolate Pt 4. Antibacterial effect of essential oil Shirazi thyme (*Zataria multiflora*), Basil (*Ocimum basilicum*), True lavender (*Lavandula angustifolia*), Fennel (*Foeniculum vulgare*), Ajwain (*Trachyspermum ammi*), Galbanum (*Ferula gummosa* boiss) and Yarrow (*Achillea eriophora*) against isolate Pt4 was measured by disk diffusion method and based on the diameter of the inhibitory halo. Basil and Shirazi thyme essential oils had the highest antibacterial effect, respectively. The results of chemical analysis of gas chromatography showed that methyl chavicol with 67.05% was the highest monoterpene compound of basil essential oil, which together with two well-known compounds of thyme including carvacrol and thymol showed a controlling effect against *P. tolaasii*. The results showed that the best effect in controlling the disease on the fungal cap at minimum inhibitory concentration (MIC) was for thymol, carvacrol and methyl chavicol, respectively, but at some concentrations higher than MIC, thymol and carvacrol caused symptoms of cap blackening. Methyl chavicol had no adverse effect against Agaricus bisporus in all concentrations used, despite having less effect on reducing pathogenicity. Therefore, the use of methyl chavicol combination can be a good option to prevent bacterial brown blotch disease in mushroom cultivation halls.

Keywords: Agaricus bisporus, Carvacrol, Methyl chavicol, *Pseudomonas tolaasii*, Thymol.