وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی

بررسی امکان کنترل باکتری های بیماریزای گیاهی توسط بریوفیت ها

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

بررسی امکان کنترل باکتری های بیماریزای گیاهی توسط بریوفیت ها

شماره ثبت: ۸۹/۹۹۱

مورخ: ۸۹/۸/۳۰

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

- **عنوان پروژه:** بررسی امکان کنترل باکتری های بیماریزای گیاهی توسط بریوفیت ها.

- **شماره مصوب:** ۸۴۰۸۲-۰۰۰۰-۰۶-۱۰۰۰۰۰-۰۰۹-۲

- **نام و نام خانوادگی نگارنده / نگارندگان:** سعید شیرزادیان (بخش تحقیقات رستنی ها) و همایون افشاری‌آزاد (بخش تحقیقات بیماری های گیاهی)

- **نام و نام خانوادگی مجریان:** سعید شیرزادیان و همایون افشاری‌آزاد

- **نام و نام خانوادگی همکار(ان):** مجید اسکندری

- **نام و نام خانوادگی مشاور(ان):** ---

- **محل اجرا:** موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران

- **تاریخ شروع:** فروردین ۱۳۸۴

- **مدت اجرا:** ۵ سال

- **ناشر:** ---

- **شمارگان (تیراژ):** ---

- **تاریخ انتشار:** ۱۳۸۸

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

چکیده ۷

واژه های کلیدی ۷

مقدمه ۸

مواد و روش ها ۹

نتایج ۱۴

بحث ۲۱

پیشنهادات ۲۳

فهرست منابع ۲۳

چکیده به زبان انگلیسی (Abstract) ۲۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف دیسک های کاغذی حاوی آنتی بیوتیک ۱۵

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک های حاوی آنتی بیوتیک ۱۶

جدول ۳- رشد باکتری ها در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف استرپتومایسین سولفات ۱۷

جدول ۴- اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی نمونه های تازه بریوفیت ۱۸

جدول ۵- اثرات ضد باکتریایی عصاره های آبی نمونه های تازه بریوفیت ۱۹

جدول ۶- اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی نمونه های خشک بریوفیت ۲۰

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱- تعدادی از بریوفیت های جمع آوری شده از مناطق مختلف ۱۰

شکل ۲- خرد کردن نمونه های بریوفیت تازه توسط ازت مایع ۱۱

شکل ۳- صاف کردن عصاره بریوفیت ها توسط فیلتر واتمن و دستگاه مکنده ۱۲

شکل ۴- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف دیسک های کاغذی حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک ۱۳

شکل ۵- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک های حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک ۱۳

شکل ۶- رشد باکتری ها در غلظت های مختلف استرپتومایسین سولفات مخلوط با محیط کشت ۱۴

شکل ۷- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف دیسک های کاغذی حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک ۱۵

شکل ۸- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک های حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک ۱۶

شکل ۹- کاهش رشد باکتری ها در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف استرپتومایسین سولفات ۱۷

شکل ۱۰- اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی چند نمونه خزه (روش دیسک کاغذی) ۱۹

چکیده:

بررسی اثرات عصاره های اتانولی نمونه های جمع آوری و عصاره گیری شده از خزه گیان (بریوفیت ها) نشان داد که از بین ۴۳ نمونه خزه و هپاتیک، عصاره های ۱۱ نمونه به اسامی: *Brachythecium albicans*, *Brachythecium salebrosum*, *Hygrohypnum luridum*, *Hypopterygium* sp., *Lidbergia* sp., *Plagiomnium undulatum*, *Plagiomnium* sp., *Porella platyphylla*, *Porella* sp., *Thamnobryum alopecurum*, *Tortula muralis*، روی حداقل یکی از باکتری های مورد آزمایش تاثیر بازدارنده رشد داشتند. نمونه ها به دو صورت تازه و خشک با دو حلال آب و اتانول عصاره گیری شدند و تاثیر آن ها در شرایط آزمایشگاه روی شش باکتری بیمارگر گیاهان به اسامی: *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium carotovora*, *Xanthomonas malvacearum* و *X. citri*، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی های مقدماتی به سه روش مختلف (ایجاد چاهک، دیسک کاغذی و مخلوط عصاره با محیط کشت) نشان داد که روش دیسک کاغذی جهت بررسی تاثیر عصاره های حاوی ترکیبات ضد باکتریایی، آسان تر و از اطمینان بیشتری برخوردار می باشد. عصاره اتانولی هفت نمونه خزه روی *R. solanacearum*، سه نمونه روی *X. citri*، سه نمونه روی *Pectobacterium carotovora*، دو نمونه روی *E. amylovora* و یک نمونه روی *Rhizobium tumefaciens* دارای اثر بازدارنده رشد بودند. عصاره هیچ یک از نمونه ها تاثیر منفی روی رشد *X. malvacearum* نداشت. اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی نمونه های خشک از نظر دامنه تاثیر همانند عصاره های اتانولی نمونه های تازه بود، اما از نظر میزان تاثیر (قطر هاله) اندکی ضعیف تر بود. عصاره های آبی نمونه های تازه بجز بر *P. carotovora*، روی دیگر باکتری های مورد نظر، تاثیر بازدارندگی قابل ملاحظه ای نشان ندادند و میزان تاثیر (قطر هاله) آن ها نیز عموما کمتر از عصاره های اتانولی بود، در حالی که از بین عصاره های آبی نمونه های خشک، تنها عصاره خزه *Tortula muralis* به مقدار اندک روی *X. citri* اثر بازدارندگی نشان داد.

واژه های کلیدی: عصاره، خزه گیان، جگرواش، باکتری های بیمارگر، ایران

مقدمه:

بریوفیت ها (خزه گیان) گیاهان ابتدایی فاقد گل، برگ، ساقه و ریشه واقعی هستند و بر خلاف نهانزادان آوندی و گیاهان دانه دار که از رویش تخم حاصل می شوند، از رشد هاگ نتیجه شده و اندام برگ، ساقه و ریشه در این گیاهان در حقیقت، نوعی ریسه یا تال با شکل های متفاوت به حساب می آیند. بیشتر گونه های این دسته از گیاهان در کنار چشمه ها، روی چوب و تنه درختان جنگل ها، شکاف سنگ ها و دره های مرطوب رشد می کنند. در چرخه زندگی بریوفیت ها دو مرحله کاملا متمایز گامتوفیت و اسپوروفیت دیده می شود. در مرحله گامتوفیت گیاه دارای اندام برگی شکل و یا ریسه دار است. ساقه و برگ های این گیاهان فاقد آوند یا بافت واقعی بوده و در مرکز ساقه فقط عده ای از سلول های طویل و باریک و کشیده به دنبال هم دیده می شوند که در این حالت، طرح تشکیل آوند غربالی در گیاهان عالی (گلدار) را متبادر می نماید. در بریوفیت ها، به جای ریشه، ریزوییید ها کار این اندام را انجام می دهند.

بریوفیت‌ها (خزه ها و جگرواش ها) جمعا شامل ۱۴ هزار گونه هستند که شامل سه رده بریوپسیده یا خزه ها، هپاتیکوپسیده یا جگرواش ها و آنتوسروپسیده یا شاخ واش ها می باشد (Frahm 2001, Asakawa 2007) که از این تعداد، تا به حال ۴۵۶ گونه آن از ایران گزارش گردیده است (Frey & Kürschner 2010).

طبق مطالعات انجام شده، برخی از متابولیت های ثانوی نظیر فلاونویید ها، ترکیبات فنلی و ترپن ها به وفور توسط بریوفیت ها تولید می شوند، اما به ندرت دارای آلکالویید می باشند. بعضی از ترکیبات به خصوص ترکیبات ترپنی تولید شده توسط خزه ها دارای اثرات ضد میکروبی هستند (Frohne & Jensen 1992). بر این اساس، جستجو برای یافتن این نوع ترکیبات در بین بریوفیت ها و استخراج و به کارگیری آن ها در کنترل عوامل بیماری زا (بیمارگر) حایز اهمیت است. به همین دلیل، در تحقیق حاضر، خزه ها به خاطر اهمیت ویژه شان از منظر گیاه پزشکی، بیشتر مد نظر قرار گرفته است.

تا کنون مطالعات فراوانی در کشور های مختلف دنیا در ارتباط با جدا سازی مواد آلی بریوفیت ها انجام گرفته است که به اهمیت و کاربرد این گیاهان در زمینه های مختلف کشاورزی و دارویی افزوده است. نتایج مطالعات نشان می دهد که بریوفیت ها نسبتا از حمله میکروارگانیزم های بیماری زا در امان هستند که این امر احتمالا می تواند ناشی از خواص ایمونولوژیکی یا ضد میکروبی‌شان باشد (Madsen & Pates 1952، Mc Cleary & Walkington, 1966، Gunnison & Alexander 1975، Glime & Saxena 1991).

از سوی دیگر، برای نگهداری نمونه های هرباریومی این گیاهان به تیمار خاصی نیاز نمی باشد. مدسن و پاتز (Madsen & Pates 1952) طی مطالعه روی هشت گونه بریوفیت، دریافتند که عصاره یک گونه *Sphagnum* sp. در جلوگیری از رشد دو گونه باکتری به اسامی: *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* موثر است.

مک کلری و همکاران (Mc Cleary *et al*. 1960) ۱۲ گونه خزه را مورد مطالعه قرار دادند که از میان آن ها دو گونه *Anomodon rostratus* و *Orthotrichum rupestre* توانایی مهار سه گونه باکتری به اسامی: *M. rubens*, *Micrococcus flavus* و *Streptococcus pygens* را داشتند. همچنین مک کلری و واکینگتون (Mc Cleary & Walkington 1966) پس از بررسی ۵۰ گونه خزه، تعداد ۱۸ گونه را در جلوگیری از رشد باکتری ها موثر معرفی نمودند.

گوپتا و سینگ (Gupta & Sing 1971) پس از تهیه عصاره اتر نفتی دو گونه خزه به اسامی: *Barbula* و *Timella*، آن ها را با موفقیت روی ۳۳ باکتری گرم مثبت و گرم منفی آزمایش کردند.

بنرجی و سن (Banerjee & Sen 1979) فعالیت آنتی بیوتیکی گونه های مختلف خزه ها را علیه برخی میکرو ارگانیزم ها شامل سه باکتری گرم مثبت، پنج باکتری گرم منفی به کار برده و دریافتند که ۱۴ گونه از ۳۱ گونه خزه قادر به مهار حداقل یک باکتری بود. به عقیده آن ها عصاره های اتانولی، متانولی، اتری و استونی نسبت به عصاره های آبی (خام و جوشانده) نتایج بهتری نشان می دهند.

بورل و همکاران (Borel *et al*. 1993) یک ماده ضد میکروبی به نام دایکرانین را از گونه ای خزه به نام *Dicranum scoparium* استخراج و آن را با موفقیت علیه چندین گونه باکتری بیمارگر گیاهان آزمایش نمودند.

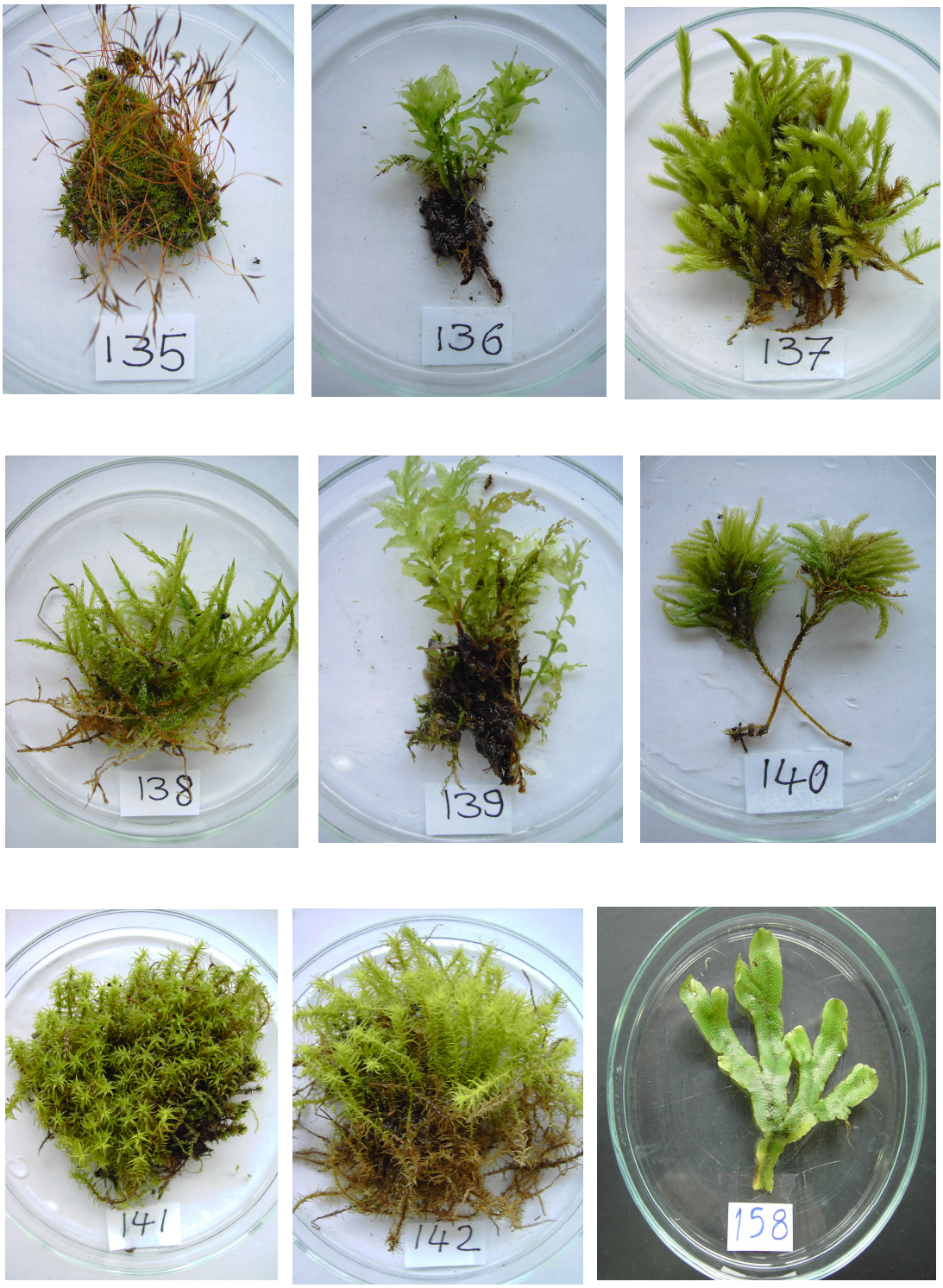
کاموری و همکاران (Kamory *et al*. 1995) و سپس باسیله و همکاران (Basile *et al*. 1999) مجددا خواص ضد باکتریایی عصاره خزه ها را با موفقیت اثبات نمودند.

در ایران، تاکنون به غیر از یک سری مطالعات مقدماتی در قالب رساله دکتری توسط میرزایی در سال ۱۳۷۸، پژوهش دیگری در این زمینه صورت نگرفته است.

مواد و روش ها:

- جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

در سال ۱۳۸۷ تعداد ۱۶ نمونه بریوفیت (با کد های ۱۳۴-۱۱۹) و در سال ۱۳۸۸ تعداد ۲۷ نمونه دیگر (با کد های ۱۶۱-۱۳۵)، از مناطق مختلف کشور جمع آوری و پس از شستشو در آزمایشگاه و شناسایی، به دو صورت تازه (شکل ۱) و خشک، عصاره گیری و مورد بررسی قرار گرفتند. آن بخش از هر نمونه که در آزمایشگاه بخش تحقیقات رستنی ها جهت شناسایی آورده شده بود، متعاقبا پس از درج اطلاعات هرباریومی و الصاق اتیکت همراه کد مخصوص، در مجموعه گیاهان وزارت جهاد کشاورزی (هرباریوم"IRAN") قرار داده شد. برای تعیین نام دقیق گونه ها از فلور ها و کلید های معتبر (Frey *et al.* 1995 and Smith 2004) استفاده گردید. مشخصات هر یک از نمونه هایی که در این قسمت از گزارش با کد های مخصوص به آن ها اشاره شده، در جداول ۴ تا ۶ در بخش های بعدی گزارش آورده شده است. ضمنا یادآور می گردد در گزارش حاضر فقط نسبت به شناسایی نمونه هایی که دارای واکنش مثبت بوده اند اقدام گردیده است.



شکل ۱- تعدادی از بریوفیت های جمع آوری شده از مناطق مختلف.

- باکتری های مورد استفاده:

برای انجام آزمایش ها، از شش گونه باکتری بیمارگر گیاهان به اسامی زیر استفاده شد:

Erwinia amylovora
Pectobacterium carotovora (= *Erwinia carotovora*)
Rhizobium tumefaciens (= *Agrobacterium tumefaciens*)
Xanthomonas malvacearum
Xanthomonas citri
Ralstonia solanacearum

- محیط کشت مورد استفاده:

در کلیه آزمایش های مربوط به بررسی اثر عصاره ها روی باکتری های فوق الذکر، از محیط کشت نوترینت آگار (NA) به مقدار ۲۰ میلی لیتر در تشتک های پتری نه سانتی متری استفاده شد.

- حلال های مورد استفاده:

برای تهیه عصاره نمونه های خزه، از آب مقطر استریل و الکل اتیلیک ۹۶٪ استفاده شد.

- تهیه عصاره:

قبل از عصاره گیری، هر نمونه خزه به دو صورت تازه (شکل ۱) و خشک به طور مجزا خرد گردید و سپس به صورت پودر درآورده شد.

در مورد نمونه های تازه، ابتدا پنج گرم نمونه خزه با استفاده از ازت مایع در هاون خرد شد و سپس با ۲۵ میلی لیتر آب مقطر یا اتانول مخلوط گردید. عصاره حاصله به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد) روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد و پس از سانتریفیوژ نمودن به مدت دو دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه، از فیلتر استریل واتمن ۰/۴۵ میکرومتر گذرانده شد تا استریل گردد (شکل ۲). شایان ذکر است، کلیه عصاره های خام بدون رقت به کار برده شده‌اند.

شکل ۲- خرد کردن نمونه های بریوفیت تازه توسط ازت مایع.

در مـورد نمونـه هـای خشـک، نخسـت نمونـه هـا را بـا آب معمـولی شستشـو داده، روی روزنامـه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت پهن نموده و پس از خشک شدن توسط آسیاب برقی خـرد گردیدنـد. بـرای عصـاره گیـری نمونه های خشک، پنج گرم از پودر خشک هر نمونه با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر یا الکـل اتیلیـک مخلـوط گردیـد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه (۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد) روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقـه قـرار داده شد. سپس مواد گیاهی با استفاده از فیلتر شماره ۱ واتمن به کمک دستگاه مکنده از عصـاره هـا جـدا گردیـد. عصاره ها در نهایت از فیلتر استریل واتمن با منافذ ۰/۴۵ میکرومتری گذرانده شد تا استریل شوند (شکل ۳).

شکل ۳- صاف کردن عصاره بریوفیت ها توسط فیلتر واتمن و دستگاه مکنده.

- روش های بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره ها:

بررسی کارآیی روش های مختلف:

قبل از انجام آزمایش های اصلی، نخست کارایی روش های مختلف (روش چاهک، دیسک کاغذی و مخلـوط کردن با محیط کشت) با استفاده از غلظت های مختلف محلـول آنتـی بیوتیـک استرپتومایسـین سـولفات بررسـی گردید.

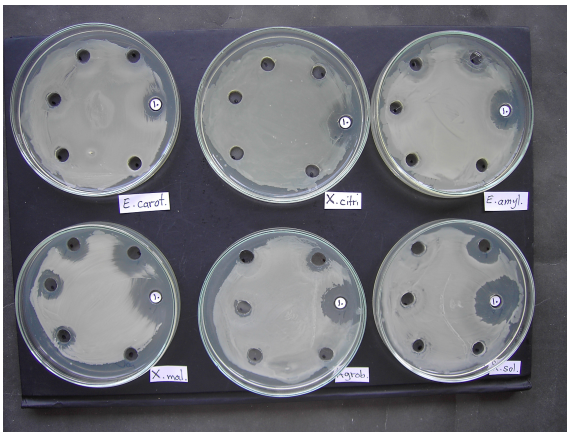
۱- روش دیسک کاغذی:

در این روش، نخست ۱۰۰ میکرو لیتر سوسپانسیون باکتری مورد نظر (با تعداد ۱×۱۰^{۸} سـلول بـاکتری در میلی لیتر) در سطح محیط کشت NA پخش گردید. سپس دیسک های کاغذ صافی به قطر شـش میلـی متـر بـا قرار دادن در اتانول ۷۰٪ به مدت پنج دقیقه، ضد عفونی شدند. پس از خشک کردن دیسک ها در شرایط استریل، در محلول های استرپتومایسین سولفات با دز های ۱۰، ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی گرم در میلی لیتـر قـرار داده شدند. دیسک های حاوی آنتی بیوتیک پس از خشک شدن در سطح محیط کشت های مذکور قـرار داده و سـپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهـداری شـدند. در نهایـت قطـر هالـه عـدم رشـد باکتری ها اندازه گیری شد.

شکل ۴- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف دیسک های کاغذی حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک.

۲- روش چاهک:

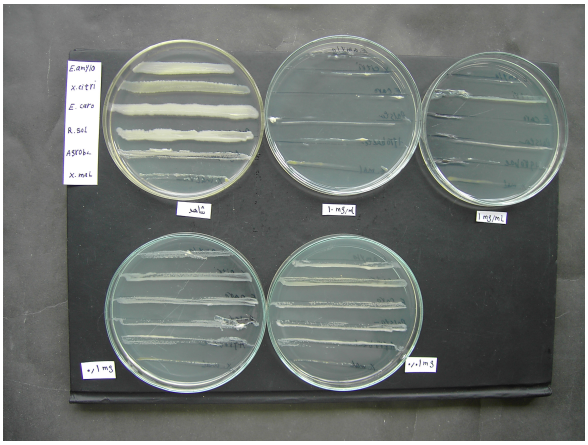
همانند روش قبلی نخست پلیت هایی که در سطح آن ها باکتری های مورد آزمایش پخش شده بود، تهیه و سپس در هر پلیت شش عدد چاهک به قطر هفت میلی متر ایجاد گردید. در هر چاهک ۵۰ میکرو لیتر محلول آنتی بیوتیک با غلظت های ذکر شده توسط سمپلر ریخته شد. انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد صورت گرفت. در نهایت قطر هاله عدم رشد باکتری ها اندازه گیری شد.



شکل ۵- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک های حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک.

۳- روش مخلوط آنتی بیوتیک با محیط کشت:

چهارصد میکرولیتر از هر غلظت آنتی بیوتیک (۱۰، ۱، ۰/۱ ، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی گرم در میلی لیتر)، با ۲۰ میلی لیتر محیط کشت NA در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد مخلوط گردید. سپس باکتری ها به صورت خطی روی محیط کشت های مذکور کشت داده شدند.



شکل ۶- رشد باکتری ها در غلظت های مختلف استرپتومایسین سولفات مخلوط با محیط کشت.

- بررسی اثر عصاره خزه ها:

با توجه به نتایج حاصله از آزمایش های انجام شده توسط محلول هـای استرپتومایسـین سـولفات و رجحـان روش دیسک کاغذی، اثرات ضد باکتریایی عصاره های آبی و الکلی نمونه های تر و خشـک خـزه هـای جمـع آوری شده به روش دیسک کاغذی مورد بررسی قرار گرفتند. جزییات مربوط به شرایط آزمایش در بخش نتایج ذکر شـده است.

نتایج:

- اثرات ضد باکتریایی محلول های استرپتومایسین سولفات:

۱- روش دیسک کاغذی:

همان گونه که جدول ۱ و شکل ۷ نشان می دهد:

- هاله های عدم رشد باکتری در غلظت های ۱۰ و یک میلی گرم در میلی لیتر استرپتومایسین سولفات در اطـراف دیسک های کاغذی به وضوح دیده می شد.

- بیشترین تاثیر بازدارنده رشد، روی باکتری *E. amylovora* و *R. solancearum* و کمتـرین تـاثیر بازدارنـده روی باکتری *X. citri*، *P. carotovora* و *R. tumefaciens* مشاهده شد.

- هالـه عـدم رشـد بـاکتری در غلظـت هـای کمتـر از ۰/۱ میلـی گـرم، تنهـا در پلیـت هـای *X. malvacearum* و *R. solancearum* قابل مشاهده بود.

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف دیسک های کاغذی حاوی آنتی بیوتیک

نام باکتری	قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف (برحسب میلی متر)				
	۱۰ میلی گرم	۱ میلی گرم	۰/۱ میلی گرم	۰/۰۱ میلی گرم	۰/۰۰۱ میلی گرم
E. amylovora	۲۵	۱۶	۰	۰	۰
P. carotovora	۱۷	۱۴	۰	۰	۰
X. citri	۱۵	۱۲	۰	۰	۰
X. malvacearum	۲۶	۲۰	۱۸	۱۷	۱۱
R. tumefaciens	۱۵	۱۳	۰	۰	۰
R. solancearum	۲۳	۱۷	۱۰	۱۰	۸

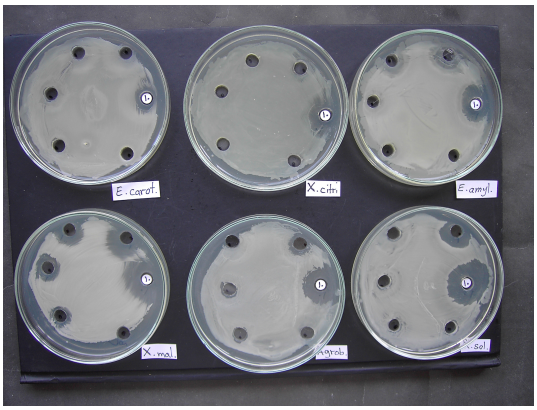
شکل ۷- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف دیسک های کاغذی حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک.

۲- روش چاهک (بر اساس جدول ۲ و شکل ۸):

- هاله عدم رشد باکتری ها تنها در غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک به وضوح دیده می شد.
- بیشترین تاثیر بازدارنده رشد روی باکتری *R. solancearum* و *E. amylovora* و کمترین تاثیر بازدارنده روی باکتری *P. carotovora* و *X. ciri* مشاهده شد که با نتایج روش دیسک کاغذی مطابقت داشت.

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک های حاوی آنتی بیوتیک

نام باکتری	قطر هاله عدم رشد در غلظت های مختلف آنتی بیوتیک (برحسب میلی متر)				
	۱۰ میلی گرم	۱ میلی گرم	۰/۱ میلی گرم	۰/۰۱ میلی گرم	۰/۰۰۱ میلی گرم
E. amylovora	۲۳	۱۶	۱۲	۰	۰
P. carotovora	۱۵	۰	۰	۰	۰
X. ciri	۱۸	۰	۰	۰	۰
X. malvacearum	۲۲	۲۰	۱۵	۱۵	۰
R. tumefaciens	۲۱	۱۲	۰	۰	۰
R. solancearum	۳۰	۲۰	۰	۰	۰



شکل ۸- هاله عدم رشد باکتری ها در اطراف چاهک های حاوی غلظت های مختلف آنتی بیوتیک.

۳- روش مخلوط آنتی بیوتیک با محیط کشت:

همان گونه که در جدول ۳ و شکل ۹ مشاهده می شود:

- تمام باکتری ها در دو غلظت بیشتر از ppm ۲ استرپتومایسین سولفات رشد نکردند.
- اختلاف حساسیت باکتری ها در غلظت های کمتر از ppm ۲ استرپتومایسین سولفات قابل مشاهده نبود.

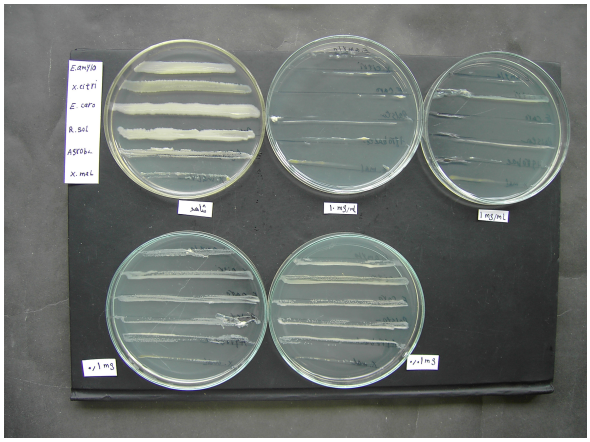
در این روش امکان اندازه گیری کمی (اندازه گیری قطر هاله عدم رشد) وجود ندارد، اما امکان افزایش مقدار عصاره امکان پذیر است.

جدول ۳- وضعیت رشد باکتری ها در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف استرپتومایسین سولفات

نام باکتری	عدم رشد و رشد در غلظت های مختلف آنتی بیوتیک				
	۲۰ ppm	۲ ppm	۰/۲ ppm	۰/۰۲ ppm	۰/۰۰۲ ppm
E. amylovora	+	+	–	–	–
P. carotovora	+	+	–	–	–
X. citri	+	+	–	–	–
X. malvacearum	+	+	–	–	–
R. tumefaciens	+	+	–	–	–
R. solancearum	+	+	–	–	–

+ : عدم رشد

– : رشد



شکل ۹- کاهش رشد باکتری ها در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف استرپتومایسین سولفات.

با توجه به نتایج به دست آمده، روش دیسک کاغذی به دلایل زیر برای انجام آزمایش های بعد انتخاب گردید:

- از حساسیت کافی برای مشاهده اثر ضد باکتریایی برخوردار است.
- حلال در اثر تبخیر به سرعت از دیسک کاغذی حذف شده، امکان اشتباه کمتر است.
- مقدار کمتری عصاره برای آزمایش لازم است.
- امکان اندازه گیری کمی تاثیر (با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری) وجود دارد.

آزمایش های اصلی

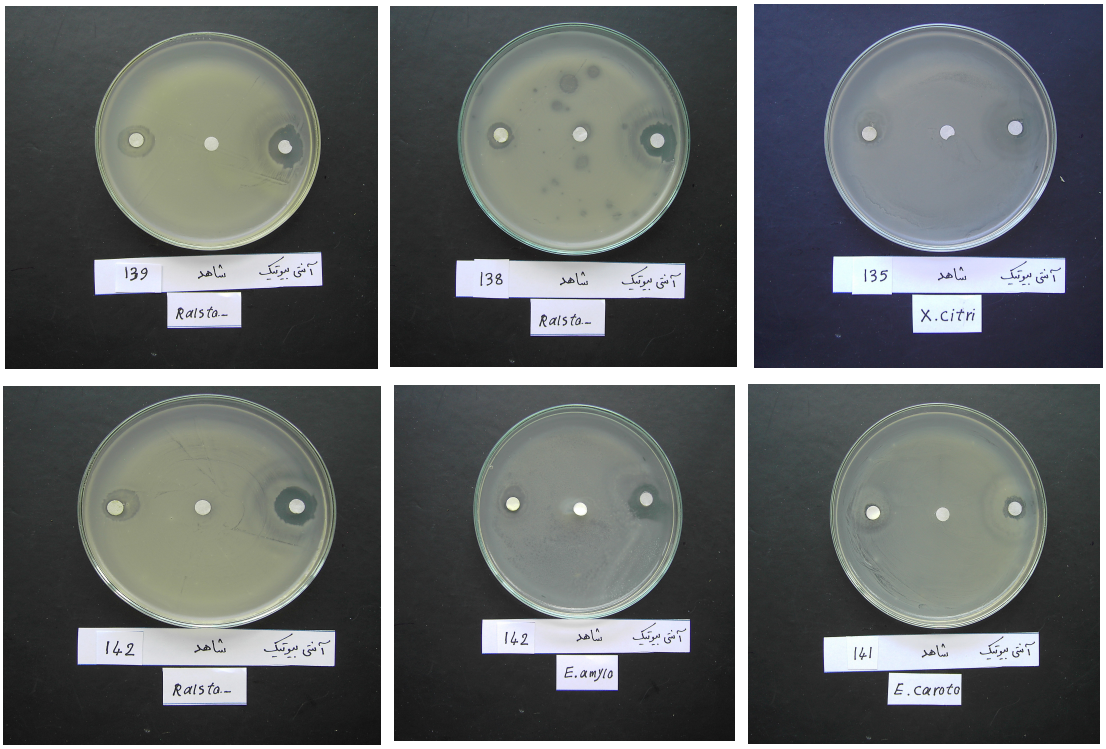
- اثرات عصاره های اتانولی نمونه های تازه بریوفیت:

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی ۴۳ نمونه تازه خزه و هپاتیک به روش دیسک کاغـذی نشـان داد (جدول ۴ و شکل ۱۰):

- عصاره های اتانولی ۱۱ نمونه بریوفیت (با کد های ۱۳۱، ۱۳۵، ۱۳۷، ۱۳۸، ۱۳۹، ۱۴۱، ۱۴۲، ۱۴۴، ۱۴۹، ۱۵۱ و ۱۵۶) حداقل روی یکی از باکتری های مورد آزمایش تاثیر بازدارنده رشد داشتند.
- عصاره های اتانولی هفـت نمونـه بریوفیـت روی *R. solanacearum*، سـه نمونـه روی *X. citri*، سـه نمونـه روی *P. carotovora*، دو نمونه روی *E. amylovora* و یک نمونه روی *R. tumefaciens* اثر بازدارنده داشتند، اما عصـاره هیچ یک از نمونه ها تاثیر منفی روی رشد *X. malvacearum* نشان ندادند.
- تیمار شاهد (آنتی بیوتیک) روی همه باکتری ها تاثیر بازدارنده داشت.

جدول ۴- اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی نمونه های تازه بریوفیت

قطر هاله بازدارنده رشد (برحسب میلی متر)							
کد بریوفیت	**نام بریوفیت**	***P. carotovora***	***E. amylovora***	***X. citri***	***X. malvacearum***	***R. tumefaciens***	***R. solancearum***
۱۳۱	*Brachythecium albicans*	-	-	-	-	-	۱۲
۱۳۵	*Tortula muralis*	-	-	۱۰	-	-	-
۱۳۷	*Brachythecium salebrosum*	-	-	۱۰	-	-	-
۱۳۸	*Hygrohypnum luridum*	-	-	-	-	-	۱۵
۱۳۹	*Plagiomnium* sp.	-	-	-	-	-	۱۷
۱۴۱	*Hypopterygium* sp.	۱۴	-	-	-	-	-
۱۴۲	*Lindbergia* sp.	-	۱۱	-	-	-	۱۶
۱۴۴	*Thamnobryum alopecurum*	-	-	-	-	-	۱۰
۱۴۹	*Plagiomnium undulatum*	۱۲	۱۰	۱۱	-	-	-
۱۵۱	*Porella platyphylla*	۱۱	-	-	-	۱۲	۱۲
۱۵۶	*Porella* sp.	-	-	-	-	-	۱۰
آنتی بیوتیک	استرپتومایسین سولفات	۱۴	۲۴	۱۴	۲۵	۱۶	۲۵



شکل ۱۰- اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی چند نمونه خزه (روش دیسک کاغذی).

- اثرات عصاره های آبی نمونه های تازه بریوفیت:

از بین عصاره های آبی ۴۳ نمونه بریوفیت، تنها عصاره های پنج نمونه (با کد های ۱۳۵، ۱۳۸، ۱۴۲، ۱۴۹ و ۱۵۶) اثرات بازدارنده رشد باکتری نشان دادند. عصاره های آبی سه نمونه روی *R. solancearum*، یک نمونه روی *X. citri* و یک نمونه روی *P. carotovora* موثر بودند (جدول ۵).

به طور کلی، در مقایسه با عصاره های اتانولی، تعداد کمتری از عصاره های آبی تاثیر ضد باکتریایی نشان دادند. همچنین میزان تاثیر (قطر هاله) آن ها عموما کمتر از عصاره های اتانولی بود.

جدول ۵- اثرات ضد باکتریایی عصاره های آبی نمونه های تازه بریوفیت

قطر هاله بازدارنده رشد (برحسب میلی متر)							
کد بریوفیت	نام بریوفیت	*P. carotovora*	*E. amylovora*	*X. citri*	*X. malvacearum*	*R. tumefaciens*	*R. solancearum*
۱۳۵	*Tortula muralis*	-	-	۹	-	-	-
۱۳۸	*Hygrohypnum luridum*	-	-	-	-	-	۱۲
۱۴۲	*Lindbergia* sp.	-	-	-	-	-	۱۲
۱۴۹	*Plagiomnium undulatum*	۱۲	-	-	-	-	-
۱۵۶	*Porella* sp.	-	-	-	-	-	۱۲
آنتی بیوتیک	استرپتومایسین سولفات	۱۵	۲۲	۱۳	۲۵	۱۵	۲۶

- اثرات عصاره های اتانولی نمونه های خشک:

اثـرات ضـد باکتریـایی عصـاره هـای اتـانولی نمونـه هـای خشـک بریوفیـت از نظـر دامنـه تـاثیر هماننـد عصاره های اتانولی نمونه های تازه بود، معهذا از نظر میزان اثر (قطر هاله) در بعضی نمونه ها قدری ضعیف تـر بـود (جدول ۶).

جدول ۶- اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی نمونه های خشک بریوفیت

قطر هاله بازدارنده رشد در حاشیه دیسک های کاغذی (برحسب میلی متر)							
کد بریوفیت	**نام بریوفیت**	***P. carotovora***	***E. amylovora***	***X. citri***	***X. malvacearum***	***R. tumefaciens***	***R. solancearum***
۱۳۱	*Brachythecium albicans*	-	-	-	-	-	۱۰
۱۳۵	*Tortula muralis*	-	-	۱۰	-	-	-
۱۳۷	*Brachythecium salebrosum*	-	-	۱۰	-	-	-
۱۳۸	*Hygrohypnum luridum*	-	-	-	-	-	۱۴
۱۳۹	*Plagiomnium* sp.	-	-	-	-	-	۱۵
۱۴۱	*Hypopterygium* sp.	۱۴	-	-	-	-	-
۱۴۲	*Lindbergia* sp.	-	۱۰	-	-	-	۱۵
۱۴۴	*Thamnobryum alopecurum*	-	-	-	-	-	۱۰
۱۴۹	*Plagiomnium undulatum*	۱۲	۱۰	۱۱	-	-	-
۱۵۱	*Porella platyphylla*	۱۱	-	-	-	۱۰	۱۰
۱۵۶	*Porella* sp.	-	-	-	-	-	۱۰
آنتی بیوتیک	استرپتومایسین سولفات	۱۵	۲۵	۱۴	۲۴	۱۷	۲۴

- اثرات عصاره های آبی نمونه های خشک:

از بـین عصـاره هـای آبـی نمونـه هـای خشـک بریوفیـت، تنهـا عصـاره نمونـه ۱۳۵ بـه مقـدار انـدک روی *X. citri* اثر بازدارنده نشان داد.

- بحث و نتیجه گیری:

بررسی مقدماتی کارایی روش های مختلف (دیسک کاغذی، ایجاد چاهک و مخلوط نمودن عصاره با محیط کشت) برای ارزیابی اثرات ضد باکتریایی محلول های حاوی ترکیبات ضد میکروبی بریوفیت ها، نشان داد که هر چند با هر سه روش مذکور، ممانعت از رشد باکتری ها را می توان مشاهده کرد، اما استفاده از روش دیسک کاغذی برای دستیابی اهداف این پروژه مناسب تر است. روش دیسک کاغذی علاوه بر اینکه از حساسیت کافی برخوردار می باشد، به دلیل تبخیر سریع حلال (اتانول)، نتایج قابل اطمینان ببار می آورد. زوسموت و همکاران (Süssmuth *et al*. 1987) ضمن برشمردن محاسن و معایب هر کدام از این روش ها به حساس بودن روش دیسک کاغذی در بررسی اثرات ضد باکتریایی آنتی بیوتیک ها اشاره کرده اند.

در بررسی حاضر، از بین عصاره های ۴۳ نمونه خزه و هپاتیک، عصاره های اتانولی ۱۱ نمونه خزه حداقل روی یکی از باکتری های مورد آزمایش تاثیر بازدارنده رشد نشان دادند. با توجه به نتایج به دست آمده در این پروژه، می توان نتیجه گیری نمود که از بین دو حلال مورد استفاده (آب و اتانول)، اتانول برای استخراج ترکیبات ضد باکتریایی مناسب تر است که نتیجه به دست آمده با بررسی های به دست آمده توسط بنرجی و سن (Banerjee & Sen 1979) کاملا مطابقت دارد. بر این اساس، عصاره های اتانولی، متانولی، اتری و استونی نسبت به عصاره های آبی (خام و جوشانده بدون رقت)، نتایج بهتری نشان دادند. نتایج آزمایش ها همچنین نشان داد که تاثیر عصاره های اتانولی نمونه های تازه بیشتر از عصاره های اتانولی همان نمونه ها به صورت خشک بود.

با توجه به جداول ۴ تا ۶، نتایج به دست آمده از انجام پروژه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی تازه و خشک گونه *Plagiomnium undulatum* (نمونه شماره ۱۴۹) که گونه ای است همه جازی و تقریبا در اغلب نقاط مرطوب مناطق شمالی و غربی کشور به آسانی یافت می شود، توانست بیشترین تاثیر بازدارندگی رشد را روی سه باکتری *P. carotovora*, *E. amylovora* و *X. citri* به اثبات رساند. این در حالی است که نمونه های شماره ۱۳۱، ۱۳۸، ۱۴۴ و ۱۵۶ هیچ گونه تاثیری علیه باکتری های مورد نظر از خود نشان ندادند. از سوی دیگر، از بین شش باکتری مورد آزمایش، *R. solanacearum* بیشترین تاثیر پذیری را نسبت به سایر باکتری ها از خود نشان داد، در صورتیکه *X. malvacearum* تحت تاثیر هیچ یک از عصاره های بریوفیت قرار نگرفت. لذا با توجه به عملکرد مثبت عصاره های چهار آرایه خزه مورد بررسی (نمونه های شماره ۱۳۱، ۱۳۷، ۱۳۹ و ۱۴۹)، می توان چنین استنتاج نمود که دستاورد های پژوهش حاضر (با توجه به گونه های بریوفیت موجود در ایران)، با بخشی از نتایج تحقیقات انجام شده توسط بنرجی و سن (Banerjee & Sen 1979) کاملا مطابقت داشته است.

با توجه به اینکه بعضی از ترکیبات ضد میکروبی گیاهان را روغن های فرار تشکیل می دهند، احتمالا مقدار این مواد ضمن عمل خشک کردن نمونه ها کاهش می یابد. طبق گزارش فرون و جنسن (Frohne & Jensen 1992)، متابولیت های ثانوی خزه ها به خصوص ترپن های آن ها، ترکیبات فعال بیولوژیکی می باشند که به صورت اجسام روغنی فرار هستند و بوی خاص اغلب خزه ها مربوط به این مواد است.

مک کلری و همکاران (Mc Cleary *et al*. 1960)، ۱۲ گونه خزه را مورد مطالعه قرار دادند که در بین آن ها عصاره های دو گونه خزه توانایی مهار سه گونه باکتری را داشتند. همچنین مک کلری و واکینگتون (Mc Cleary & Walkington 1966) پس از بررسی ۵۰ گونه از خزه ها، تعداد ۱۸ گونه را در جلوگیری از رشد باکتری ها موثر معرفی نمودند. طبق گزارش بنرجی و سن (Banerjee & Sen 1979) از ۳۱ گونه خزه بررسی شده، عصاره اتانولی ۱۴ گونه توانست حداقل یک باکتری را مهار کند.

در مورد این که اثرات ضد باکتریایی خزه های مورد بررسی مربوط به کدام گروه از ترکیبات شیمیایی آن هاست، در حال حاضر نمی توان به طور دقیق اظهار نظر نمود. طبق بررسی های انجام شده، خزه ها از نظر دارا بودن پیگمان های فتوسنتزی (کلروفیل a و b)، نشاسته و فروکتان ها به عنوان ماده ذخیره ای و سلولز در دیواره سلولی با سایر گیاهان سبز تفاوتی ندارند. اما کوتین، سوبرین و لیگنین در آن ها یافت نمی شود (Frohne & Jensen 1992). فلاونویید ها تقریبا در ۵۰ ٪ از خزه های وجود دارد. اما در خزه های شاخی و اعضای رده های Polytrichidae، Andreaeopsida، Sphagnopsida و Tetraphididae یافت نمی شود. در جگرواش ها برحسب تیره، انواع خاصی از فلاونویید دیده می شود. تاکنون وجود فلاون C و گلیکوزید ها، دی هیدرو فلاون، فلاونول ها، دی هیدروکالن ها و گالاکترونید ها در خزه ها به اثبات رسیده است. همچنین ایزوفلاون ها، بی فلاون ها و ۳- دزاکسی آنتوسیانین ها در خزه ها یافت شده است. ترکیبات فنلی از جمله مشتقات کافییک اسید از جمله اسفاگنومیک اسید در خزه های تورفی (turf mosses) و در بعضی از خزه ها باستثنای جگرواش ها، بی بنزیل ها (bibenzyle) یافت می شوند. در خزه ها تاکنون ۲۴ مونوترپن، ۱۷۲ سسکویی ترپن، ۴۴ دی ترپنویید، ۱۴ تری ترپنویید و ۱۳ استرویید تشخیص داده شده است. مونو- و سسکویی ترپن ها فقط در جگرواش ها و خزه های برگی و تری ترپنویید ها تنها در خزه های برگی یافت می شوند. این ترکیبات در جگرواش ها به صورت اجسام روغنی وجود داشته و بوی خاص اغلب خزه ها مربوط به این مواد است. مواد معطره مونوترپنی شامل لمونن (Limonen)، پینن (Pinen)، ژرانیول (Geraniol)، بورنئول (Borneol) و سسکویی ترپن ها از نوع المن (Eleman)، یودسمن (Eudesman)، ژرمکرن (Germacran)، بیسابولان (Bisabolan) هستند. اجسام روغنی آبی رنگ *Calypogeia trichomanis* مربوط به آزولن (Azulene) است. اغلب سسکویی ترپن ها در گیاهان عالی نیز یافت می شود. دی ترپن ها از نوع لابدان (Labdan)، کلرودان (Clerodan)، کاران (Kauran)، همچنین دولابلان (Dolabellan) و ساکولاتان (Sacculatan) هستند که تنها در خزه ها یافت می شوند (Frohne & Jensen 1992).

ترکیبات ذکر شده فوق، به خصوص ترپن ها، ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند. اثرات ضد میکروبی (ضد قارچی و ضد باکتریایی)، هرچند تاکنون به طور کافی بررسی نشده است، مقاومت در مقابل قارچ ها و باکتری ها برای خزه ها دارای اهمیت زیادی است. بدین جهت انتظار می رود که همه خزه ها حاوی نوعی از ترکیبات ضد میکروبی باشند. از بین این ترکیبات تاثیر ضد میکروبی پلی گودیال (Polygodial) موجود در *Porella* و نورپین-گایسن (Norpin-guison) موجود در *Conocephalum conicum* و لونولارین (Lunularin) موجود در *Lunularia cruciata* به اثبات رسیده است (Frohne & Jensen 1992).

در این ارتباط، شایان ذکر است که برخی خزه ها نظیر *Frullania tamarisci* دارای اثرات آلرژی زا برای انسان هستند و مشخص شده است که عامل این حساسیت، لاکتون ها هستند (Frohne & Jensen 1992). بنابراین، لازم است پس از شناسایی ترکیبات ضد میکروبی خزه ها و قبل از تولید انبوه و استفاده عملی از آن ها، نسبت به بررسی آلرژی زایی آن ها برای انسان و سایر موجودات زنده اقدام شود.

پیشنهادات:

۱- از آنجایی که امکان دارد از طریق اسانس گیری نتایج بهتری به دست آید، پیشنهاد می شود، در قالب پروژه جدید اثرات ضد باکتریایی اسانس خزه های موثر بررسی شود.

۲- با توجه به گستردگی گونه *Plagiomnium undulatum* (نمونه شماره ۱۴۹) که گونه ای است همه جازی و تقریبا در اغلب نقاط مرطوب کشور در مناطق مختلف استان های شمالی تا غربی کشور یافت می شود، با توجه به نتایج مثبتی که طی تحقیق حاضر از آن به دست آمده است، می توان آن را به آسانی از طبیعت جمع آوری و پس از عصاره گیری از آن جهت کنترل سه باکتری بیمارگر گیاهان یعنی *E. amylovora*، *P. carotovora* و *X. citri* استفاده نمود.

۳- اثرات عصاره ها و اسانس خزه های مذکور روی قارچ های بیمارگر گیاهان نیز بررسی شود.

فهرست منابع:

میرزایی، معصومه. ۱۳۷۸. بررسی ویژگی های ریخت شناسی، ساختاری و تکوینی برخی خزه های ایران و اثرات ضد میکروبی آن ها. رساله دکترای زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

Asakawa, Y. 2007. Biologically active compounds from bryophytes. Pure Appl. Chem. 79 (4): 557-580.

Banerjee, R.D. and Sen, S.P. 1979. Antibiotic activity of Bryophytes. The Bryologist 82 (2): 141-153.

Basile, A., Giordano, S., LóPes-Sáez, J.A. and Cobianchi, R.C. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoides isolated from mosses. Phytochemistry 52: 1479-1482.

Basile, A., Giordano, S., Sorbo, S. and Vuotto, M.L. 1998. Pharmaceutical Biology 36 (1): 25-28.

Borel, C., Welti, D.H., Ferndes, I., and Colmenares, M. 1993. Dicranin, an antimicrobial and 15-hypoxygenase inhibitor from the moss *Dicranum scoparium*. J. Nat. Pr. 56 (7): 1071-1077.

Frahm, J.P. 2001. Biologie der Moose. Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin.

Frahm, J.P. 2004. Recent developments of commercial products from bryophytes. The Bryologist 107 (3): 277-283.

Frey, W., Frahm, J.-P., Fischer, E. and Lobin, W. 1995. The Liverworts, Mosses and Ferns of Europe (English edition revised and edited by T.L. Blockeel, 2006). 512 pp. Harley Books, England.

Frey, W. and Kürschner, H. 2010. New and noteworthy records to the bryophyte flora of Iran. Nova Hedwigia 90 (3-4): 503-512.

Frohne, D. and Jensen, U. 1992. Systematik des Pflanzenreichs unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. 4. Auflage, G. Fischer, Stuttgart, Jena, New York, S. 70-74.

Glime, J.M. and Saxena, D. 1991. Uses of Bryophtes, today and tomorrows. New Delhi.

Gunnison, D. and Alexander, M. 1975. Resistance and susceptibility to decomposition by natural microbial communities. Limnology and Oceanology 20: 64-70.

Gupta, K.G. and Singh, B. 1971. Occurrence of antibacterial activity in moss extracts. Res. Bull. Panjab Univ. Sci. 22 (1/2): 237-239.

Kamory, E., Keserü, G.M. and Papp, B. 1995. Isolation and antibacterial activity of Marchantiin A., a cyclic bis (Biphenyl) constituent of Hungarian *Marchantia polimorpha*. Planta Medica 61: 387-388.

Madsen, G.C. and Pates, A.L. 1952. Occurrence of antimicrobial substances in chlorophyose plants growing in Florida. Bot. Gaz. 113: 293-300.

Mc Cleary, J.A., Sypherd, D.S. and Walkinton, D.L. 1960. Mosses as possible source of antibiotics. Science 131: 108.

Mc Cleary, J.A. and Walkinton, D.L. 1966. Mosses and antibiosis. Rev. Bryol. et Lichénol. 24: 309-314.

Pates, A.L. and Madsen, G.C. 1955. Occurrence of antimicrobial substances in chlorophyllose plant growing in Florida II. Bot. Gaz. 116: 250-261.

Smith, A.J.E. 2004. The Moss flora of Britain and Ireland. 2nd. edition, 1012 pp., University Press, Cambridge.

Subhisha, S. and Subramoniam, A. 2005. Antifungal activity of a steroid from *Pallavicinia lyellii*, a liverwort. Indian Journal of Pharmacology 37 (5): 304-308.

Süssmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R. and Springer, W. 1987. Biochemisch-microbiologisches Praktikum. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 409.

****

Abstract

In order to study the *in vitro* antibacterial (bactericidal) activities of bryophyte, a research project on this topic was performed during 2006-2010. Since chemical compounds present in these plants are still remained unknown in Iran, therefore, 43 bryophyte specimens (mosses & liverworts) were freshly collected, washed, dry-powdered and then extracted in different solvents including water (raw and boiled), methanol, ethanol, acetone and petroleum ether. Among these solvents, the broadest spectrum of their inhibitory effects on some plant pathogenic bacteria, was mainly shown by the ethanolic and water extracts derived from 11 bryophyte species (for detail, refer to the Persian text). Both fresh and dried bryophyte specimens were, therefore, extracted with these two solvents and their impacts were then successfully examined against six pathogenic bacteria, namely, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium carotovora*, *Rhizobium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas malvacearum* and *X. citri*. The preliminary results of three different performed methods (injection of extract into agar well, paper disc, and agar medium mixed with extract) showed that, the paper disc method proved to be a more reliable and even easier than the other two. Dried specimen extracts on their impact point of view on one hand, were similar to the ethanolic fresh specimen extracts and the aqueous extracts of the same specimen extracts on the other hand, showed lesser inhibitory effects. This is interesting to note that, none of the extract showed negative effects on *X. malvacearum*.

Key words: Extract, Moss, Liverwort, Pathogenic Bacteria, Iran

Ministry of Jihad-e-Agriculture
Research, Education and Extension Organization
Iranian Research Institute of Plant Protection

Project Title: Antibacterial Activities of Bryophytes.

Project No.: 2-009-100000-06-0000-84082

Researchers: Saeed Shirzadian (Department of Botany) and Homayoun Afshari Azad (Plant Diseases Research Department)

Advisers: ---

Location: Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran

Starting Date: 2006

Duration: 5 years

Publisher: Iranian Research Institute of Plant Protection

Tirage: ---

Date of Issue: 2010

MINISTRY OF JIHAD-E-AGRICULTURE
RESEARCH, EDUCATION AND EXTENSION ORGANIZATION

Iranian Research Institute of Plant Protection

FINAL REPORT OF PROJECT/RESEARCH

Antibacterial Activities of Bryophytes

SAEED SHIRZADIAN
AND
HOMAYOUN AFSHARI AZAD

Register No. 89/991