

اثر باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی برگ گیاه صبر زرد بر *Erwinia amylovora* و *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

رضا رضائی¹، سلیمان جمشیدی^{2*}، ابوالقاسم قاسمی³

تاریخ دریافت: 93/6/25 تاریخ پذیرش: 93/8/27

چکیده

امروزه مهار زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با هدف کاهش تهدیدات زیست محیطی و خطرات آفت‌کش‌های شیمیایی یک اولویت می‌باشد. در این راستا، استفاده از کارآیی ضد میکروبی مواد گیاهی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه اثر بازدارندگی عصاره اتانولی، متانولی، استونی و کلروفومی بخش‌های مختلف برگ گیاه صبر زرد شامل برگ کامل، بخش پارانشیمی، ژل و شیرابه بر رشد باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک سیب و گلابی و *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* عامل بلایت باکتریایی گردو با روش نشر در آگار و اثر باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی با روش حداقل غلظت باکتری‌ایستایی و کشنده مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام بخش‌های برگ گیاه صبر زرد به جز شیرابه روی باکتری‌ها اثر بازدارنده و کشنده داشتند. با این حال، باکتری *X. arboricola* pv. *juglandis* بیشتر از *E. amylovora* به فرآورده‌های گیاهی صبر زرد حساسیت نشان داد. حلال کلروفورم حلال مناسبی برای عصاره‌گیری از اندام‌های گیاهی صبر زرد برای آزاد شدن مواد ضدباکتری نبود. عصاره‌های بخش پارانشیمی و نیز شیرابه بر باکتری *E. amylovora* باکتری ایستا و کشنده نبودند ولی اثرگذارترین تیمار بر بازدارندگی رشد *X. arboricola* pv. *juglandis* بود. عصاره‌های ژل برگ صبر زرد بر هر دو باکتری اثر کشندگی بسیار بیشتری داشتند. در کل، 31 ماده از مواد گیاهی گیاه صبر زرد با روش کروماتوگرافی گازی استخراج شد که 25 مورد آن در شیرابه گیاه یافت شد. مواد ضدباکتری چون سینامیک اسید، تترادکانوئیک اسید، 2-هیدروکسی پروپینیت، سیتوسترول، لوپنول و کاروون و 1-هپتانول، 2-پروپیل و 1-بنزن‌دی-کربوکسیلیک اسید در قسمت‌های مختلف برگ گیاه صبر زرد به عنوان مواد ضدباکتریایی حضور داشت. با توجه به پتانسیل ضدباکتریایی عصاره‌های برگ گیاه صبر زرد، این خاصیت را می‌توان برای مهار زیستی بیماری آتشک درختان دانه‌دار و بلایت باکتریایی گردو مدنظر قرار داد.

واژه‌های کلیدی: آلوئه ورا، مهار زیستی، ترکیبات طبیعی گیاهی، خاصیت ضدباکتریایی، آتشک سیب و گلابی، بلایت گردو

¹ - دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران.

² - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد میانه، باشگاه پژوهشگران و نخبگان، میانه، ایران.

³ - مربی پژوهش، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: s.jamshidy@gmail.com

مقدمه

گیاه صبرزرد (*Aloe vera* (L.) Burm. F.) گیاهی زیتنی، دارویی، پایا و مقاوم به خشکی با برگ‌های گوشتی و آبدار از تیره سوسنیان است که از اعصار قدیم با اهداف درمانی متنوع مورد استفاده بشر بوده است. بررسی‌های مختلف نشان از وجود ترکیبات فعال در ژل و قسمت سبز برگ آن دارد (Mehrabian *et al.*, 2012). برگ گیاه صبر زرد دارای ترکیبات فنلی متنوعی است که همگی به عنوان عوامل ضد میکروبی قوی شناخته شده‌اند (Ammayappam and Jeyakodi Moses, 2009). اسید سالیسیلیک ترکیب دیگری در گیاه صبر زرد است که دارای خواص ضدباکتری بالایی است (Salar and Suchitra, 2009). همچنین ترکیباتی مثل تانن، ساپونین و فلاونوئید از این گیاه استخراج شده است (Arunkumar and Muthuselavam, 2009). ژل گیاه صبر زرد دارای بیش از 200 نوع ترکیب مختلف شامل ساکاریدها، آنزیم‌ها، استروئول‌ها و طیف گسترده‌ای از اسیدهای آمینه و مواد معدنی می‌باشد و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی مطرح است. همچنین اثر ضد میکروبی ژل متانولی گیاه صبرزرد علیه چند قارچ و باکتری گرم مثبت و منفی گزارش شده است (Lawrence *et al.*, 2009). طیف وسیع‌تری از فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ و عصاره ژل روی تعدادی از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای انسانی گزارش شده است (Agarry *et al.*, 2005). اثر عصاره‌های اتانولی و متانولی ژل گیاه صبر زرد در مهار باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی چشمگیر عنوان شده و ترکیباتی نظیر اسید پ-کوماریک، اسکوربیک و سیانیک از آنها استحصال شده است (Lawrence *et al.*, 2009). عصاره استونی برگی مؤثرتر از عصاره آبی، اتانولی و متانولی علیه *Aspergillus niger* و *A. flavus* عنوان شده است (Arunkumar and Muthuselavam, 2009). عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی گیاه صبر زرد در برابر سویه‌های باکتری *Escherichia coli* نیز به عنوان مؤثرترین حلال‌ها گزارش شده‌اند (Irshad *et al.*, 2011). تجمع مواد ضدباکتری بیشتر در برگ‌های داخلی گیاه صبر زرد است (Salar and Suchitra, 2009). مطالعه حاضر برای ارزیابی اثر بازدارندگی، باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی عصاره‌های تهیه شده از بخش‌های مختلف برگ و ژل و شیرابه گیاه صبر زرد با حلال‌های مختلف و نیز تعیین ترکیبات فنلی آنها انجام شد.

استفاده مکرر و بی‌رویه از ترکیبات شیمیایی برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی، علاوه بر آلودگی محیط زیست، موجب بروز پدیده مقاومت به آفت‌کش‌ها شده و خسارت عوامل بیماری‌زای گیاهی را افزایش و سلامتی بشر را نیز تهدید می‌کنند (Afzal *et al.*, 1997). اکثر آفت‌کش‌های گیاهی، ساخته دست بشر و شیمیایی هستند و متأسفانه اغلب رویکردهای اتخاذ شده یکی دو قرن اخیر با کشاورزی پایدار مغایرت دارد (Narayanasamy, 2002). گیاهان منابعی غنی از مواد ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که از زمان روم باستان در طب سنتی و نیز تهیه مواد دارویی فرموله شده مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از ترکیبات گیاهی و طبیعی در مهار آفات و بیماری‌های گیاهی، یکی از راه‌کارهای کاهش مخاطرات زیست محیطی است (Afzal *et al.*, 1997). اسانس‌ها و بسیاری از متابولیت‌های ثانوی و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت زیستی متفاوت از جمله خواص ضد میکروبی می‌باشند (Rodriguez *et al.*, 2005; Tepe *et al.*, 2004; Cowan, 1999) و این امر باعث شده تا موضوع جایگزینی سموم شیمیایی با مواد طبیعی امن و دوستدار محیط زیست در مجامع علمی دنیا مطرح شود (Hassanzadeh, 2005).

استفاده از ترکیبات گیاهی و طبیعی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی، یکی از راه‌کارهای کاهش مخاطرات زیست محیطی است (Afzal et al., 1997). اسانس‌ها و بسیاری از متابولیت‌های ثانوی و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت زیستی متفاوت از جمله خواص ضد میکروبی می‌باشند (Rodriguez et al., 2005; Tepe et al., 2004; Cowan, 1999) و باعث شده تا موضوع جایگزینی سموم شیمیایی با مواد طبیعی امن و دوست‌دار محیط زیست در مجامع علمی دنیا مطرح شود (Hassanzadeh, 2005). بیماری آتشک سیب و گلابی از بیماری‌های خسارت‌زا در درختان میوه دانه‌دار می‌باشد (Sharon and Douglas, 2003). عامل این بیماری باکتری *Erwinia amylovora* است و در حال حاضر در استان‌های تهران، آذربایجان، قزوین، زنجان خساراتی زیادی را وارد می‌کند (Rezaei and Hassanzadeh, 1997). به دلیل مخرب بودن بیماری و درجه شدت آلودگی، روش‌های کنترل پیشنهادی به ویژه در سال‌های اخیر به علت شرایط محیطی و رطوبت نسبی بالا چندان موثر نبوده است (Hansen, 2009). برای مهار شیمیایی این بیماری از اکسی کلرور مس و استرپتومایسین استفاده می‌شود که این سم در موقع شکوفه مورد استفاده قرار می‌گیرد که اخیراً عامل بیماری به سم اکسی کلرور مس و استرپتومایسین مقاوم شده است (Hassanzadeh, 2005). بیماری لکه برگی یا بلایت باکتریایی ناشی از *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* مهمترین بیماری باکتریایی گردو در مناطق گردوکاری جهان به شمار می‌رود (Kałużna et al., 2014). خسارت این بیماری عمدتاً در اثر صدمه به میوه است و میزان آن بیش از مجموع خسارت دیگر بیماری‌های گردو برآورد شده است (Buchner et al., 2001). به طوری که این خسارت در صورت عدم مبارزه به ویژه در ارقام زودبرگده به 80% نیز می‌رسد (Kałużna et al., 2014). درختان جوان بیشتر مورد حمله این باکتری قرار می‌گیرند و در موقع بارندگی و رطوبت زیاد خسارت بیماری چندین برابر می‌شود (Buchner et al., 2001). در صورت عدم اعمال اقدامات مهار بیماری، ممکن است خسارت بیماری به صددرصد هم برسد (Kałużna et al., 2014). هدف از این تحقیق زیست سازگار، بررسی امکان کاربرد ژل، عصاره و شیرابه گیاه صبر زرد در جهت اعمال بازدارندگی و یا مهار عوامل آتشک درختان دانه‌دار و بلایت باکتریای گردو در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری و فرآورده‌های گیاهی صبر زرد

سویه بیماری‌زای باکتری *E. amylovora* (Ea) و *X. arboricola* pv. *juglandis* (Xaj) از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت و روی محیط کشت آگار مغذی¹ خالص‌سازی و تا موقع استفاده در یخچال 4 درجه سلسیوس نگهداری شد. سوسپانسیون باکتری با مقایسه با استاندارد نیم مک‌فارلند در غلظت $1/5 \times 10^8$ سلول در میلی لیتر تنظیم شد. مقدار 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در پتری حاوی محیط کشت مولر هیتتون آگار (Merck Co.; Germany) ریخته شده و با پیپت پاستور سترون روی آن پخش شد. نمونه‌های برگ گیاه صبر زرد از مرکز جهاد دانشگاهی استان البرز تهیه و به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه انتقال یافت.

¹ NA (Nutrient Agar)

برگ‌ها با آب مقطر شسته و با الکل 70% ضدعفونی سطحی گردید. برای استخراج شیرابه¹ برگ‌های جوان گیاه صبر زرد از انتها به صورت عرضی برش داده شده و به مدت 24 ساعت داخل پتری‌دیش قرار شد. پس از خروج شیرابه برگی، 0/1 میلی‌لیتر از آن با 1 میلی‌لیتر حلال خنثی ترکیب شد (Mehrabian et al., 2012). پارانشیم سبز رویی و زیری برگ به صورت طولی برش داده شده و بخش باقیمانده شامل ژل برگ گیاه صبر زرد در آون 50 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت خشک و با استفاده از هاون دستی کوبیده و پودر شد. قسمت سبز پارانشیمی برگ و نیز برگ کامل دربرگیرنده بخش پارانشیمی، ژل و شیرابه به قطعاتی به ابعاد حدود 1 تا 2 سانتی‌متر تقسیم و در دمای معمول آزمایشگاه به مدت چهار روز هوا خشک و به مدت 24 ساعت در آون با دمای 50 درجه سلسیوس قرار گرفته و در نهایت پودر شد. مقدار 5 گرم از پودر ژل در 10 میلی‌لیتر، 20 گرم از پودر بخش پارانشیم برگی و 20 گرم از پودر برگ کامل در 100 میلی‌لیتر از پنج حلال متانول، اتانول، کلروفرم، استون (Merck Co.; Germany) و آب در بالن ریخته شده و به مدت دو روز روی شیکر قرار گرفت. سپس به مدت 20 دقیقه با سرعت 3000 دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hetich 22 R; Germany) شد. برای جدا کردن حلال از عصاره و تغلیظ آن، از دستگاه روتاری به همراه پمپ خلاء (Heidolph; Germany) استفاده شد. عصاره حاصله (عصاره خشک) جهت استفاده بعدی در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره خشک، به ترتیب 7، 35 و 0/3 میلی‌گرم از عصاره غلیظ برگ کامل، برگ بدون ژل و ژل گیاه صبر زرد در 1 میلی‌لیتر حلال خنثی دی‌متیل-سولفوکساید² حل شد. تمام مواد گیاهی به دست آمده از گیاه صبر زرد با از عبور از فیلتر 0/22 میکرون سترون شد. **آزمون زیست‌سنجی نشر در آگار**

برای آزمون زیست‌سنجی با روش نشر در آگار، ابتدا یک دیسک سترون 6 میلی‌متری (شرکت پادتن طب، ایران) با 15 میکرولیتر از غلظت ذکر شده از عصاره ژل، بخش پارانشیمی و برگ کامل گیاه صبر زرد آغشته شده و به همراه دیسک‌های آماده استرپتومایسین (شرکت پادتن طب، ایران) به عنوان شاهد مثبت و حلال خنثی به عنوان شاهد منفی در محیط کشت هیتون آگار تلقیح شده با باکتری قرار گرفت. تست‌ها در دمای 37 درجه سلسیوس نگهداری و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر پس از 24 ساعت اندازه‌گیری شد.

حداقل غلظت بازدارنده و کشنده عصاره‌ها

برای تعیین اثر باکتری‌ایستایی عصاره‌ها و شیرابه از روش تعیین حداقل غلظت باکتری‌ایستایی³ با روش رقت در آگار یا لوله‌های ترقیق حاوی محیط کشت مولر هیتون براث⁴ (21 گرم در لیتر) استفاده شد. غلظت‌های اولیه عصاره‌ها طبق آزمون نشر در آگار تهیه شد. از نه لوله آزمایش حاوی 1 میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد. به یکی از لوله‌ها به عنوان شاهد مثبت باکتری و به دیگری به عنوان شاهد منفی حلال خنثی اضافه شد. در هفت لوله باقیمانده با روش رقیق سازی متوالی⁵ رقت‌های 35، 17/5، 8/75، 4/37، 2/19، 1/09، 0/54، 0/27 میلی‌گرم در

¹ latex

² dimethyl sulfoxide (DMSO) تعیین اثر باکتری

³ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

⁴ Muller Hinton broth

⁵ serial dilution

میلی‌لیتر برای برگ بدون ژل و 0/3، 0/15، 0/075، 0/038، 0/019، 0/009 و 0/005 میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای ژل و 7، 3/5، 1/75، 0/875، 0/438، 0/219، 0/109 میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای برگ کامل تهیه و کشت گردید. لوله‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری و رقتی که در آن رشدی از باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی¹ باکتری، از لوله‌هایی که رشدی در آنها قابل مشاهده نبود به مقدار 15 میکرو لیتر روی محیط کشت جامد مولر هیتون آگار انتقال و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظتی که بعد از انتقال هیچ رشدی از باکتری مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی فرآورده‌های گیاهی صبر زرد

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Hewlett-Packard 6890; USA) استفاده شد. طرح آماری مورد استفاده در این آزمون‌ها از نوع طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بود و نتایج با نرم افزار SPSS ver. 16 تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح 5% انجام شد.

نتایج

آزمون‌های زیست‌سنجی

تجزیه واریانس میانگین قطر هاله بازدارنده پرگنه باکتری‌های مورد مطالعه در اثر اعمال تیمارهای مختلف شامل عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های مختلف از برگ کامل، بخش پاراننشیمی برگ، ژل و شیرابه برگ گیاه صبر زرد نشان داد که بین تیمارها در سطح احتمال 1% اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول‌های 1 و 4).

جدول 1- تجزیه واریانس قطر هاله بازدارنده پرگنه *E. amylovora* ناشی از اعمال عصاره، ژل و شیرابه برگ صبر زرد

منبع تغییرات	درجه آزادی	جمع مربعات	میانگین مربعات	F مقدار	P مقدار
تیمار	14	114/800	8/200	3/833	0/0001
خطای آزمایش	30	36/000	1/200		
کل	44	150/800			

دیسک آغشته به حلال خنثی به عنوان شاهد منفی، هیچ نوع هاله‌ی بازدارنده‌ای در هیچ یک از باکتری‌ها ایجاد نکرد که این امر تأییدکننده بی‌اثر بودن حلال مورد استفاده از لحاظ ممانعت از رشد باکتری‌های مورد بررسی است (جدول‌های 2 و 5). در مجموع باکتری *Xaj* حساسیت بیشتری نسبت به *Ea* به تیمارها از جمله استرپتومایسین و فرآورده‌های گیاهی صبر زرد نشان داد (جدول‌های 2، 3، 5 و 6).

¹ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

جدول 2 - قطر هاله بازدارنده پرگنه *E. amylovora* در اثر عصاره‌های برگ، ژلی، برگ کامل و شیرابه گیاه صبر زرد

شاهد	استرپتومایسین	شیرابه	بخش پارانیشیمی	ژل	برگ کامل	تیمار حلال
			6/00 ^d	8/33 ^{abc}	6/66 ^{cd}	متانول
			6/00 ^d	9/33 ^{ab}	10/33 ^a	اتانول
6/00 ^d	9/66 ^{ab}	6/00 ^d	6/00 ^d	7/00 ^{cd}	9/66 ^{ab}	استون
			6/00 ^d	6/00 ^d	8/00 ^{b-d}	کلروفرم

استرپتومایسین روی باکتری *Xaj* حدود دو برابر باکتری *Ea* بازدارنده رشد بود. شیرابه صبر زرد بر رشد هیچ کدام از دو باکتری بازدارنده نبود (جدول‌های 2 و 4). همچنین عصاره بخش پارانیشیمی بر رشد باکتری *Ea* بازدارندگی نداشت. ژل به عنوان تنها ماده بازدارنده رشد *Ea* بود. با توجه به بازدارنده نبودن شیرابه و بخش پارانیشیمی، بازدارندگی عصاره برگ کامل نیز به احتمال زیاد به ژل برگ مربوط است (جدول 2). عصاره‌های اتانولی و استونی برگ کامل و عصاره‌های متانولی و اتانولی ژل بازدارنده‌ی رشد باکتری *Ea* بود. عصاره‌های بخش پارانیشیمی و شیرابه بر *Ea* باکتری ایستا و باکتری کش نبودند. باکتری‌ایستایی و نیز باکتری‌کشی عصاره های ژلی بسیار بیشتر از عصاره‌های برگ کامل بود. عصاره کلروفرمی برگ کامل روی باکتری *Ea* خاصیت باکتری‌کشی یا باکتری‌ایستایی نداشت در حالی که عصاره کلروفرمی ژل بر آن باکتری ایستایی نشان داد ولی کشنده نبود (جدول 3). با این تفاسیر، کلروفرم گزینه مناسبی برای عصاره گیری از گیاه صبر زرد برای آزاد شدن مواد ضدباکتری علیه *Ea* به شمار نمی‌رود. همه فرآورده‌های گیاهی باکتری‌ایستا به جز عصاره کلروفرمی ژل بر باکتری *Ea* کشنده نیز بودند و غلظت کشنده با دو تا پنج برابر کردن غلظت باکتری ایستا به دست آمد. تفاوت زیادی در حداقل غلظت کشنده و باکتری ایستای عصاره برگ و ژل بر باکتری *Ea* با حلال‌های مختلف به جز کلروفرم مشاهده نشد (جدول 3).

عصاره‌های بخش پارانیشیمی اثرگذارترین تیمارها بر بازدارندگی رشد *Xaj* بودند که با استرپتومایسین در یک سطح آماری قرار داشتند. هیچ یک از تیمارهای دیگر نتوانستند با استرپتومایسین رقابت کنند. عصاره‌های ژلی بازدارندگی کمتری بر *Xaj* داشتند به طوری که عصاره کلروفرمی و استونی ژل با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد و فقط عصاره‌های متانولی و اتانولی ژل بر این باکتری بازدارنده بودند. عصاره‌های به دست آمده از برگ کامل نسبت به ژل اثر ضعیف‌تر و نسبت به بخش پارانیشیمی برگ اثر قوی‌تر داشتند. تنها بخشی از گیاه صبر زرد که نتوانست بر رشد باکتری *Xaj* بازدارنده باشد، شیرابه بود (جدول 5). عصاره کلروفرمی برگ کامل بر باکتری *Xaj* باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی نشان نداد. عصاره‌های ژل در مقایسه با عصاره‌های برگ و پارانیشیمی در غلظت‌های پایین‌تری بر باکتری *Xaj* باکتری‌ایستایی نشان دادند. عصاره‌های کلروفرمی برگ کامل و ژل و عصاره استونی ژل نتوانستند بر باکتری *Xaj* کشنده باشند. باکتری‌ایستاترین ترکیب روی این باکتری عصاره اتانولی ژل بود و عصاره

اتانولی بخش پارانشیمی برگ نیز ضعیف‌ترین عصاره از لحاظ باکتری‌ایستایی نسبت به سایرین بود. کشنده‌ترین ترکیبات روی باکتری *Xaj* عصاره متانولی و اتانولی ژل تشخیص داده شد (جدول 6).

جدول 3 - حداقل غلظت بازدارنده و کشنده عصاره‌های برگ کامل، ژل و بخش پارانشیمی برگ و شیرابه گیاه صبر زرد بر *E. amylovora*

حد اقل باکتری‌کشی بر باکتری‌ایستایی	حد اقل غلظت باکتری‌کشی (میلی گرم در میلی لیتر)	حد اقل غلظت باکتری‌ایستا (میلی گرم در میلی لیتر)	حلال	فرآورده گیاهی
2	7	3/5	متانول	برگ کامل
2	7	3/5	اتانول	
4	7	1/75	استون	
-	-	*	کلروفرم	
2/33	0/07	0/03	متانول	ژل
5	0/15	0/03	اتانول	
2	0/15	0/07	استون	
-	-	0/03	کلروفرم	
-	-	-	متانول	بخش پارانشیمی
-	-	-	اتانول	
-	-	-	استون	
-	-	-	کلروفرم	
-	-	-	-	شیرابه

* علامت (-) به معنی عدم تأثیر باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی عصاره در تمام از غلظت‌های به کار رفته است.

جدول 4- تجزیه واریانس قطر هاله بازدارنده پرگنه *X. a. pv. juglandis* تحت تأثیر فرآورده‌های گیاهی صبر زرد

مقدار P	مقدار F	میانگین مربعات	جمع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
0/0001	16/933	51/175	716/444	14	تیمار
		3/022	90/667	30	خطای آزمایش
			807/111	44	کل

جدول 5 - قطر هاله بازدارنده پرگنه *X. a. pv. juglandis* تحت تأثیر فرآورده‌های گیاهی صبر زرد

شاهد	استرپتومایسین	شیرابه	بخش پارانیشیمی	ژل	برگ کامل	تیماز حلال
			41/67 ^{bc}	9/66 ^e	11/33 ^{de}	متانول
			16/33 ^{abc}	10/67 ^{de}	11/33 ^{de}	اتانول
6/00 ^f	18/00 ^a	6/00 ^f	15/33 ^{abc}	8/33 ^{ef}	31/33 ^{cd}	استون
			71/33 ^{ab}	6/00 ^f	9/00 ^{ef}	کلروفورم

جدول 6 - حداقل غلظت بازدارنده و کشنده عصاره‌های برگ کامل، ژل و بخش پارانیشیمی برگ و شیرابه گیاه صبر زرد بر *X. a. pv. juglandis*

حد اقل باکتری کشتی بر باکتری ایستایی	حد اقل غلظت باکتری کشتی (میلی گرم در میلی لیتر)	حد اقل غلظت باکتری ایستا (میلی گرم در میلی لیتر)	حلال	فرآورده گیاهی
4	3/5	0/87	متانول	برگ کامل
4	1/75	0/43	اتانول	
4	7	1/75	استون	
-	-	*	کلروفورم	
2	0/3	0/15	متانول	ژل
33	0/3	0/009	اتانول	
-	-	0/3	استون	
-	-	0/3	کلروفورم	
2	5	2/5	متانول	بخش پارانیشیمی
2	10	5	اتانول	
10	5	0/5	استون	
2	5	2/5	کلروفورم	
-	-	-	-	شیرابه

* علامت (-) به معنی عدم تأثیر باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی عصاره در تمام از غلظت‌های به کار رفته است.

ترکیبات شیمیایی استخراج شده از گیاه صبر زرد

در کل، 31 ماده شیمیایی از برگ گیاه صبر زرد با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی استخراج شد. عصاره اتانولی برگ کامل محتوی کلیه ترکیبات مذکور به جز تترادکانوییک اسید بود. این ماده در عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی برگ کامل و در هیچ یک از عصاره‌های ژل و بخش پارانیشیمی یافت نشد. به نظر می‌رسد که این ماده عمدتاً در شیرابه گیاه صبر زرد حضور داشته باشد. این ترکیب در عصاره کلروفورمی برگ کامل و به ویژه

شیرابه با بالاترین درصد نسبت به سایر مواد در آنها حضور داشت. ظاهراً حلال‌های استون، متانول و اتانول در از بین رفتن آن در عصاره‌های مربوطه نقش داشته‌اند. بیست و پنج نوع از ترکیبات شناسایی شده در شیرابه یافت شد. موادی چون 2-هیدروکسی اتیل پروپیونیت، متیل فوران، سینامیک اسید، اسکوالن، کاروون، سیتروسترول و لوپتول در شیرابه حضور نداشت. ترکیب 2-هیدروکسی پروپیونیت در بخش پارانشیمی و با فراوانی بیشتر در ژل حضور داشت و می‌تواند یکی از عوامل ضدباکتری بودن این قسمت‌های برگ گیاه صبر زرد باشد. حلال کلروفورم در آزاد شدن 2-هیدروکسی پروپیونیت در عصاره‌های برگ‌گی و ژلی مؤثرتر از سایر حلال‌ها به ویژه از بخش پارانشیمی برگ و برگ کامل عمل نموده است. متیل فوران نیز در بخش پارانشیمی برگ، ژل و برگ کامل به ویژه در عصاره‌های کلروفورمی حضور داشت. سینامیک اسید به عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی با سمیت اندک موجود در گیاهان با طیف وسیع فعالیت ضد میکروبی شامل ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضد ویروسی است (Sova, 2012) که در تمامی عصاره‌های برگ‌گی و ژلی یافت شد ولی در شیرابه وجود نداشت. این ترکیب به ویژه در ژل به عنوان یکی از فراوان‌ترین مواد یافت شد. اسکوالن نیز در کلیه عصاره‌های برگ و ژل به فراوانی یافت شد ولی در شیرابه وجود نداشت. ماده سیتروسترول، کاروون و لوپتول در ژل موجود نبود اما در قسمت پارانشیمی برگ به مقدار زیاد دیده شد. دو نوع ویتامین C و E یافت شد که ویتامین E از تمام بخش‌های برگ‌گی با تمام عصاره‌ها استخراج شد، در حالی که ویتامین C در عصاره‌های بخش پارانشیمی حضور نداشت و تنها در عصاره‌های متانولی و اتانولی ژل و برگ کامل و نیز در شیرابه یافت شد. عصاره‌های ژل نسبت به سایرین کمترین ترکیبات شناخته شده را دارا بودند و تنها 14 ترکیب از 31 ترکیب یافت شده، در عصاره‌های مختلف ژل یافت شد (جدول 7).

بحث

نتایج به دست آمده از آزمون‌های زیست‌سنجی و نیز تعیین ترکیبات شیمیایی برگ گیاه صبر زرد نشان می‌دهد که تمام قسمت‌های برگ اعم از بخش پارانشیمی یا پوست برگ، ژل و شیرابه حاوی مواد ضدباکتریایی می‌باشند. با این حال، شدت بازدارندگی، باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی عصاره‌های به دست آمده از این قسمت‌ها بر حسب باکتری مورد مطالعه با هم متفاوت است که به دلیل ماهیت مواد و میزان تجمع مواد ضدباکتریایی در بخش‌های مختلف برگ‌گی و نیز میزان حساسیت باکتری‌ها به ترکیبات موجود است. همچنین استفاده از حلال مناسب به ویژه متانول و اتانول در این تحقیق می‌تواند در آزاد شدن مقدار بیشتری از مواد ضدباکتریایی مؤثر باشد. در این راستا، احتمالاً استفاده از حلال‌هایی نظیر دی‌اتیل اتر و هگزان ممکن است در آزاد شدن این ترکیبات در عصاره‌های به دست آمده اثرگذار باشد. خاصیت کشندگی و باکتری‌ایستایی برگ گیاه صبر زرد بر دو باکتری مورد استفاده در تحقیق حاضر بیشتر به موادی مربوط می‌شود که در ژل حضور دارند در حالی که سایر بخش‌های برگ‌گی نسبت به ژل از خاصیت باکتری‌ایستایی و به ویژه باکتری‌کشی ضعیف‌تری برخوردار می‌باشند.

جدول ۷) ترکیبات شیمیایی شناسایی شده از عصاره‌های مختلف و شیرابه برگ گیاه صبر زرد با روش کروماتوگرافی گازی

نام ترکیب شیمیایی	پارانشیم برگ						ژل						کل برگ		
	زمان بازبینی (دقیقه)	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت	نسبت
Para-Xylene	۳/۱۰	۶/۱	۵/۷	۴/۱	۳/۳	-	-	-	-	۲/۹	۱/۱	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۹	
1,5-heptadien-4-one	۳/۸۶	۳/۳	۵/۲	۲/۸	۲/۵	-	-	-	۲/۵	۰/۹	۱/۲	۱/۰	۱/۸		
Benzyl aldehyde	۴/۳۵	-	-	-	-	-	-	-	۸/۲	۲/۰	۰/۹	۲/۹	۵/۷		
Undecan	۵/۴۰	-	-	-	-	-	-	-	-	۱/۷	۱/۱	-	۴/۱		
1-heptanol, 2-propyl	۷/۱۱	-	-	-	-	-	-	-	۴/۹	۱/۵	۲/۴	۱/۷	۵/۲		
Tricyclene	۷/۸۶	۱/۸	۱/۱	۰/۸	۱/۰	۲/۶	۲/۱	۲/۳	۲/۸	۱/۱	۰/۹	۱/۵	۱/۱		
Tridecane	۸/۳۳	۳/۲	۴/۶	۲/۹	۲/۱	-	-	-	۳/۴	۲/۵	۱/۲	۰/۹	۵/۷		
2-hydroxy ethyl propionate	۱۱/۸۶	۴/۷	۱/۴	۲/۳	۲/۵	۵/۴	۶/۸	۶/۴	۴/۶	۱/۴	۱/۶	۱/۳	-		
Hexadecane	۱۳/۰۵	-	-	-	-	۲/۴	۲/۰	۲/۳	۲/۷	۰/۹	۰/۲	۱/۰	۳/۳		
8-methyl octahydrocumarin	۱۲/۹۵	۱/۸	۱/۲	۱/۰	۱/۸	-	-	-	۱/۹	۱/۳	۱/۱	۱/۸	۲/۱		
Tetradecanoic acid	۱۴/۲۶	-	-	-	-	-	-	-	۳/۹	-	-	-	۱۴/۹		
Hexadecanoic acid methyl ester	۱۶/۵۶	۳/۳	۴/۰	۴/۹	۹/۷	۱۰/۱	۷/۹	۹/۵	۱۲/۸	۲/۵	۴/۴	۵/۵	۸/۸		
1,2-Benzen dicarboxylic acid	۱۷/۵۰	-	-	-	-	-	-	-	-	۱/۱	۰/۹	۱/۴	۲/۱		
n-hexadecanoic acid	۱۸/۶۵	۵/۲	۹/۳	۶/۰	۴/۰	۳/۶	۷/۱	۵/۳	۴/۸	۲/۸	۶/۷	۴/۴	۳/۳		
11,14- Eicosadienoic acid methyl ester	۱۹/۲۶	۳/۹	۰/۸	۰/۹	۱/۲	-	-	-	۳/۹	۱/۰	۱/۶	۲/۲	۵/۱		
7-tetradecan	۱۹/۹۲	۶/۷	۱/۰	۰/۷	۱/۴	-	-	-	۵/۳	۰/۸	۱/۱	۱/۶	۴/۰		

تترادکانویک اسید که عمدتاً در شیرابه یافت شد نوعی اسید چرب اشباع متداول در برخی گیاهان مثل روغن نارگیل است و در شیرابه برگ گیاه صبر زرد هم شناخته شده که آنتی اکسیدان و دارای فعالیت ضدسرطانی و نماتدکشی است (Lakshmi and Rajalakshmi, 2011). این ترکیب و برخی مشتقات آن به عنوان ماده ای با پتانسیل ضدباکتریایی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی شناخته شده است و با توجه به فراوانی آن در شیرابه، یکی از عوامل مهم مسؤول خاصیت ضدباکتریایی برگ گیاه صبر زرد می‌تواند باشد (Balasubramaniani et al., 2006). با این حال حضور مواد ضدباکتری در شیرابه نتوانست بر دو باکتری مورد استفاده در تحقیق حاضر اثرگذار باشد. ترکیب 2-هیدروکسی پروپیونیت¹ ماده‌ای است که به عنوان باکتری‌کش به شامپوها اضافه می‌شود (de Jaham, 2003). همچنین، برخی از مشتقات متیل فوران نیز به عنوان مواد ضدباکتری شناخته شده اند (Siwek et al., 2009). اسکولون² شناسایی شده در بخش‌های مختلف برگ گیاه صبر زرد مشخصاً به عنوان یک ماده ضدباکتری و آنتی-اکسیدان شناخته شده است (Lakshmi and Pa Rajalakshmi, 2011). مواد موجود در بخش پارانیشیمی مثل ماده سیتروسترول به عنوان ترمیم کننده زخم‌ها و ماده ای با پتانسیل ضد میکروبی (Kiprono et al., 2000) و کاروون³ به عنوان افزایش دهنده ساز و کار دفاعی پوست و با پتانسیل ضد میکروبی (Khan and Sastry, 2009) و لوپئول به عنوان یک ماده ضدسرطان و ضدباکتری (Suryati, 2011) احتمالاً موادی هستند که مسؤول خاصیت ضدباکتریایی بخش پارانیشیمی برگ می‌باشند. همچنین سینامیک اسید به عنوان یکی از قوی‌ترین ترکیبات ضد میکروبی (Sova, 2012) به فراوانی در تمام بخش‌های برگ غیر از شیرابه موجود بودند و می‌تواند برای ارزیابی بیشتر در آینده علیه باکتری‌های بیماریزا مورد آزمون بیشتری واقع شود. ماده 1-هپتانول، 2-پروپیل به عنوان یک ماده ضد میکروب در برگ صبر زرد شناخته شده (Lakshmi and Rajalakshmi, 2011) و بیشتر در شیرابه و برگ کامل حضور داشت ولی در هیچ یک از عصاره‌های ژل و بخش پارانیشیمی مشاهده نشد. ماده ضد میکروب دیگر، 1و2 بنزن دی کربوکسیلیک اسید بود (Lakshmi and Pa Rajalakshmi, 2011) که باز هم در شیرابه و عصاره‌های برگ کامل به جز عصاره کلروفورمی یافت شد.

شیرابه به لحاظ برخورداری از تعدد مواد ضد میکروبی با توجه به این که در استفاده از آن هیچ نوع حلالی هم استفاده نشد و از این دیدگاه می‌تواند اقتصادی هم باشد، می‌تواند به عنوان بخش مناسبی از برگ برای استفاده در تجاری سازی و فرموله کردن فرآورده گیاهی مدنظر قرار گیرد. با این حال، بخش ژلی برگ، از مواد کشنده تر و باکتری ایستاتری برخوردار بوده و مطالعه بیشتر برای تجاری سازی این بخش می‌تواند در این زمینه تحولی قابل توجه را سبب شود. لازم است ترکیبات شناسایی شده از بخش‌های مختلف برگ به طور خالص روی باکتری آزموده شود تا دقیقاً مشخص شود که کدام ماده در بازدارندگی و کشندگی باکتری مؤثر بوده است. این کار ممکن است به فرموله شدن ماده شناسایی شده و در نهایت کاربردی شدن و تجاری شدن فرآورده به دست آمده منتهی شود.

¹ 2-hydroxy ethyl propionate

² squalene

³ carvone

References

1. Afzal AM, Rahber-Bhatti MH and Aslam M. 1997. Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris* subsp. *citri*. International Journal of Pest Management 43: 149–153.
2. Agarry OO, Olaleye MT and Bello-Michael CO. 2005. Comparative antimicrobial activities of *Aloe vera* gel and leaf. African Journal of Biotechnology 4(12): 1413–1414.
3. Ammayappam L and Jeyakodi Moses J. 2009. Study of antimicrobial activity of *Aloe vera*, chitosan, and curcumin on cotton, wool, and rabbit hair. Fibers and Polymers 10(2): 161–166.
4. Arunkumar S and Muthuselavam M. 2009. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against clinical pathogens, World Journal of Agricultural Sciences 5(5): 572–576.
5. Balasubramanian N, Vishnukant M and Avinash D. 2006. Design, synthesis, antibacterial, and QSAR studies of myristic acid derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16(11): 3023–3029.
6. Buchner RP, Olson WH and Adaskaveg JE. 2001. Walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) control investigations in Northern California, USA. Acta horticulturae (ISHS) 544: 369–378.
7. Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12: 564–582.
8. de Jaham C. 2003. Effects of an ethyl lactate shampoo in conjunction with a systemic antibiotic in the treatment of canine superficial bacterial pyoderma in an open-label, nonplacebo-controlled study. Veterinary Therapeutics 4(1): 94–100.
9. Hansen MN. 2009. Fire blight of ornamentals. Virginia State University 1–2.
10. Hassanzadeh N. 2005. Technology of natural plant materials, emphasizing on fire blight disease. Agricultural Science 11: 58–53.
11. Irshad S, Butt M. and Younus H. 2011. In vitro antibacterial activity of *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*). International Research Journal of Pharmaceuticals 1(2): 59–64.
12. Kałużna M, Pulawska J, Waleron M. and Sobiczewski P. 2014. The genetic characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight in Poland. Plant Pathology 63(6): 1404–1416.
13. Kiprono PC, Kaberia F, Keriko JM and Karanja JN. 2000. The *in vitro* anti-fungal and anti-bacterial activities of beta-sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). Zeitschrift für Naturforschung C 55 (5-6): 485–488.
14. Lakshmi PTV and Rajalakshmi P. 2011. Identification of phyro-components and its biological activities of *Aleo vera* through gas chromatography-mass spectrometry. International Research Journal of Pharmacy 2(5): 247–249.
15. Lawrence R, Tripathi P and Jeyakumar E. 2009. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from *Aloe vera*. Brazilian Journal of Microbiology 40: 906–915.
16. Mehrabian S, Majd A, Junubi P. and Kheyri A. 2012. Evaluation of latex and gel of *Aleo vera*'s various extracts properties by Ames test. Arak Medical University Journal 15 (2): 100–106.
17. Narayanasamy PN. 2002. Microbial plant pathogens and crop disease management. Science Publishers: USA. 572 p.

18. Rezaei M and Hassanzadeh N. 1997. Evaluation of some plant extracts on *Erwinia amylovira* causal agent of apple and pear fire blight. *Journal of Journal of Construction Research* 37: 34–37.
19. Rodriguez DJ, Castillo DH, Garcia RR and Sanchez JLA. 2005. Antifungal activity of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 21: 81–87.
20. Salar R. and Suchitra L. 2009. Evaluation of antimicrobial potential of different extracts of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. *African Journal of Microbiology Research* 3(3): 97–100.
21. Sharon DR, Douglas M. 2003. Fire blight. Department of Plant Pathology and Ecology, the Connecticut Agricultural Experiment Station 1–8.
22. Siwek A, Wujec M, Stefańska J and Paneth P. 2009. Antimicrobial Properties of 4-Aryl-3-(2-methyl-furan-3-yl)- Δ^2 -1, 2, 4-triazoline-5-thiones. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* 184(12): 3149–3159.
23. Sova M. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 12(8): 749–67.
24. Suryati S, Hazli N, Dachriyanus D and Hj Lajis MN. 2011. Structure elucidation of antibacterial compound from *Ficus deltoidea* Jack leaves. *Indonesian Journal of Chemistry* 11(1): 67–70.
25. Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D. and Vardar-Unlu G. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry* 7: 519–525.

Bacteriostatic and bactericidal potential of *Aloe vera* leaf against *Erwinia amylovora* and *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

R. Rezaei¹, S. Jamshidi*², A. Ghasemi³

Abstract

Nowadays, biocontrol of plant pathogens is a priority to reduce environmental effects of chemical pesticide applications. In this regard, antimicrobial plant products are in the center of attention. In this study, the inhibitive potential of methanol, ethanol, acetone, and chloroform extracts of rind, gel, latex and whole leaf of *Aloe vera* was evaluated using agar diffusion disc method against *Erwinia amylovora* and *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Also, bacteriostatic and bactericidal activities were tested by minimal inhibitive and bactericidal concentration methods. All leaf parts of *A. vera* had antibacterial potential against these bacteria except for latex. However, *X. arboricola* pv. *juglandis* was more sensitive to Aloe products than *E. amylovora*. Chloroform was not suitable solvent for releasing antibacterial substances from Aloe. Rind extracts had no bactericidal or bacteriostatic effects on *E. amylovora* but they were the most effective ones on *X. arboricola* pv. *juglandis*. Gel extracts had much more bactericidal potential on both bacteria. On the whole, 31 chemicals were identified using gas chromatography which 25 of them were found in latex. Some antibacterial substances such as cinnamic acid, tetradecanoic acid, 2-hydroxy propionate, sitosterol, carvone, lupeol, 1-heptanol, 2-propyle, 1,2- benzene di-carboxylic acid were found in different parts of *A. vera* leaf. The antibacterial activity of *A. vera* against the causal agents of apple and pear fire blight and walnut bacterial blight can be considered as a biocontrol potential in the future.

Keywords: *Aloe vera*, natural control, antibacterial, biocontrol, fire blight, walnut bacterial blight.

¹- Former MSc student, Department of Horticultural Science, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran.

²- Assistant Professor, Islamic Azad University, Miyaneh Branch, Young Researchers and Elite Club, Miyaneh, Iran.

³- Research Instructor, Plant Pathology Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

*Corresponding author: s.jamshidy@gmail.com