مجله دانش نوین
کشاورزی پایدار
جلد ۱۰ شماره ۲
صفحات ۱۹-۱۱

خاصیت باکتری‌کشی و باکتری‌ایستایی عصاره‌های گیاهی و اسانس سرخارگل علیه باکتری *Xanthomona arboricola* pv. *juglandis* عامل بلایت باکتریایی گردو

سلیمان جمشیدی*
دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
میانه، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
s.jamshidi@m-iau.ac.ir
(مسؤل مکاتبات)

سودابه اندرگانی
دانش‌آموخته کارشناس ارشد
رشته فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، ادویه ای و عطری
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد میانه
میانه، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
soudabehandargani92@gmail.com

مهدی اورعی
استادیار گروه علوم باغبانی
دانشکده کشاورزی
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد میانه
میانه، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
moraei@yahoo.com

چکیده امروزه توجه روزافزون به مهار زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با هدف کاهش تهدیدات و خطرات زیست محیطی آفت‌کش‌های شیمیایی معطوف شده و از این رو کارآیی ضدمیکروبی مواد گیاهی به عنوان فرآورده‌های امن طبیعی در سال‌های اخیر مورد کنکاش واقع شده است. در این مطالعه ارزیابی اثر فرآورده‌های گیاهی به‌دست آمده از گیاه سرخارگل روی باکتری بیماری‌زای گیاهی *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* عامل بلایت باکتریایی گردو مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره‌های گل، برگ، ساقه و ریشه سرخارگل به روش خیساندن با حلال‌های آب، استون، اتانول، متانول و کلریدریک‌اسید استخراج شده و با دستگاه روتاری در خلا تغلیظ شد. اسانس گل سرخارگل با دستگاه کلونجر استخراج شد. فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها و اسانس سرخارگل علیه این باکتری در آزمایشگاه و با روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حساسیت باکتری به اسانس گل بیش از عصاره‌های سایر اندام‌ها بود. اتانول حلال مناسبی برای استخراج مواد ضدباکتریایی از اندام‌های مختلف سرخار گل بود. عصاره اتانولی ریشه نسبت به عصاره‌های به دست آمده از سایر قسمت‌های گیاه بازدارندگی بیشتری داشت. همچنین عصاره‌های آبی و تا حدی استونی و اسیدکلریدریک اثر چندانی بر باکتری از خود نشان ندادند. همه عصاره‌های گیاهی و اسانس سرخارگل بر این باکتری بازدارنده رشد بودند. عصاره‌های برگی نیز بیشتر از این که کشنده باشند، دارای خاصیت بازداری از رشد بودند. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد مواد گیاهی به دست آمده از سرخارگل می‌تواند کارآیی قابل ملاحظه‌ای روی این باکتری داشته و در آینده برای مهار زیستی این باکتری مد نظر قرار داده شود.

شناسه مقاله:
نوع مقاله: **پژوهشی**
تاریخ پژوهش: **۱۳۹۲**
تاریخ دریافت: **۹۳/۰۲/۱۲**
تاریخ پذیرش: **۹۳/۰۵/۰۶**

واژه‌های کلیدی:
- ***Echinacae purpurea***
- **مهار زیستی**
- **خاصیت ضدباکتریایی**
- **تولیدات طبیعی**
- **مدیریت بیماری‌های گیاهی**
- **سوختگی باکتریایی گردو**

مقدمه سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* Moench از تیره آفتابگردان گیاهی علفی و چندساله از شمال آمریکا و از جمله گیاهان دارویی مهم با کاربرد وسیعی در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی است. این گیاه با وجود این که بومی ایران نیست در سال‌های اخیرکشت و کار آن معمول شده است.[۷] مواد مؤثره موجود در ریشه و پیکر رویشی سرخارگل خاصیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی ضدقارچی، ضدباکتری و ضدویروسی دارند و در درمان سرماخوردگی و بیماری‌های تنفسی و مجاری ادراری استفاده می‌شود و به عنوان داروی بالقوه برای درمان بیماری ایدز به شمار می‌رود.[۱۲،۱۵،۱۶] تمام پیکره این گیاه از ریشه تا بخش رویشی دارای مواد ضدمیکروبی ارزشمندی است و شیکوریک‌اسید[1] به عنوان مؤثرترین ماده در سرخارگل شناخته شده است.[۱۹] عصاره‌های گیاهی سرخارگل باکتری‌های مفید روده را تحریک و در نتیجه حضور باکتری‌های گرم منفی مانند *Escherichia coli* را کاهش می‌دهد. پلی‌ساکاریدها از اجزای تشکیل دهنده عصاره سرخارگل باعث افزایش تولید اسید لاکتیک و در نتیجه افزایش تکثیر باکتری‌های مفید در روده و کاهش حضور باکتری‌های گرم منفی مانند *E. coli* می‌شوند.[۱۰] گزارش‌ها حاکی از فعالیت ضدباکتریایی پلی‌استیلن‌های استخراج شده از ریشه گیاه سرخارگل در مقابل *E. coli* می‌باشد.[۱۷] عصارهٔ سرخارگل به عنوان تحریک‌کننده رشد و افزاینده مقاومت ماهی اسکار[2] در برابر عفونت باکتریایی گزارش شده است.[۲] سرخارگل به عنوان آنتی‌اکسیدان و بهبودبخش زخم با اثرات ضدباکتریایی و ضدویروسی و جلوگیری از عفونت شده و مانع رشد سلول‌های سرطانی می‌شود [۹]. فرآورده‌های تهیه شده از سرخارگل بر بیماری‌های تنفسی ناشی از باکتری‌ها که گاه با آلودگی‌های ویروسی نیز همراه می باشند، اثر رضایت بخشی دارد.[۹،۱۹] عصاره سرخارگل سبب تحریک سیستم ایمنی بدن شده و دفاع بدن را مقابل آلودگی‌های باکتریایی افزایش می‌دهد.[۹]

بیماری‌های گیاهی از مهمترین عوامل محدود کننده کشاورزی هستند که هر ساله بخش قابل توجهی از تولیدات گیاهی را از بین می‌برند.[۲۱] 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.[۱] اکثر آفتکش‌های گیاهی، ساخته دست بشر و شیمیایی هستند و متأسفانه اغلب رویکردهای اتخاذ شده یکی دو قرن اخیر با کشاورزی پایدار مغایرت دارد.[۱۱]

استفاده از ترکیبات گیاهی و طبیعی در مهار آفات و بیماری‌های گیاهی، یکی از راه‌کارهای کاهش مخاطرات زیست محیطی است.[۱] اسانس‌ها و بسیاری از متابولیت‌های ثانوی و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت زیستی متفاوت از جمله خواص ضدمیکروبی می‌باشند.[۵،۱۴،۲۲] و این امر باعث شده تا موضوع جایگزینی سموم شیمیایی با مواد طبیعی امن و دوستدار محیط زیست در مجامع علمی دنیا مطرح شود.[۶] بیماری لکه برگی یا بلایت باکتریایی ناشی از *Xanthomonas arboricola* Vauterin *et al.* pv. *juglandis* مهمترین بیماری باکتریایی گردو در مناطق گردوکاری جهان به شمار می‌رود.[۸،۱۵] خسارت این بیماری عمدتاً در اثر صدمه به میوه است و میزان آن بیش از مجموع خسارت دیگر بیماری‌های گردو برآورد شده است. به طوری که این خسارت در صورت عدم مبارزه به ویژه در ارقام زودبرگده به ۸۰٪ نیز می‌رسد.[۹] درختان جوان بیشتر مورد حمله قرار می‌گیرند و در بارندگی و رطوبت زیاد خسارت چندین برابر می‌شود.[۶] در صورت عدم اعمال اقدامات مهار بیماری، خسارت بیماری به ۱۰۰٪ هم می‌رسد.[۱۵] این مطالعه با هدف تعیین کارآیی عصاره اندام‌های مختلف گیاهی و اسانس گل سرخارگل بر مهار،

[1] chichoric acid
[2] Oscar fish

کشندگی و بازدارندگی از رشد باکتری *X. arboricola* pv. *juglandis* انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری و عصاره ها و اسانس گیاهی

سویه بیمارگر باکتری *X. arboricola* pv. *juglandis* از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور دریافت و به محیط کشت آگارمغذی منتقل شد. محیط‌های کشت مایه زنی شده با باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. گیاه سرخارگل از مزرعه گیاهان دارویی روستای کلخوران اردبیل به صورت تر تهیه و اندام‌های مختلف آن شامل گل، ساقه، برگ و ریشه جداگانه و در سایه و شرایط آزمایشگاهی خشک شد. عصاره‌گیری با استفاده از پنج حلال متانول ۸۰٪، استون ۵۰٪، کلریدریک‌اسید ۵۰٪، اتانول ۷۰٪ و آب انجام گرفت. برای تهیه عصاره از روش خیساندن[1] استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا اندام‌های مختلف سرخارگل به تفکیک با مخلوط کن خرد گردید. سپس مقدار ۵۰ گرم از پودر گیاهی به ۵۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های ذکر شده اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شد. ظرف ارلن مایر محتوی مخلوط تهیه شده، طی این مدت چندین بار تکان داده شد. محتویات ارلن از یک لایه کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد. پس از عصاره‌گیری حلال باید از عصاره جدا شود این کار با روش تقطیر در خلاء و با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سلسیوس انجام شد و به این ترتیب عصاره غلیظ به دست آمد.. سپس عصاره غلیظ داخل پتری‌دیش‌های شیشه‌ای ریخته شده و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت به صورت عصاره خشک درآمد. برای تهیه غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاهی، ۲۰ میلی‌گرم از عصاره خشک و غلیظ شده سرخارگل در ۱ میلی‌لیتر حلال خنثی دی متیل سولفوکسید[2] حل و با فیلتر سر سرنگ ۰/۲۲ میکرون سترون شد. اسانس‌گیری با ۵۰ گرم از پودر گل به روش تقطیر با آب به مدت ۴ ساعت در دستگاه کلونجر انجام شده و توسط سولفات سدیم بی آب رطوبت‌زدایی شد. نمونه به دست آمده تا آزمون زیست سنجی در ظرف شیشه‌ای تیره و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید.[۷]

آزمون نشر در آگار

برای انجام این آزمون از محیط کشت مولر هینتون آگار ۳۸ گرم در لیتر استفاده شد. بعد از ریختن محیط کشت، تشتک‌های پتری در زیر هود قرار داده شد تا محیط کشت کاملاً بسته شود. جدایه خالص باکتری توسط سوزن سترون برداشته و در محلول سرم فیزیولوژی سترون حل شد. سوسپانسیون تهیه شده از باکتری با استاندارد نیم مک فارلند (10^6 سلول باکتری در میلی‌لیتر) مقایسه گردید تا از لحاظ میزان کدورت برابر باشند. صد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت ریخته شده و به وسیله پیپت پاستور سترون، به طور کامل روی آن پخش و برای مدت ۲۵-۲۰ دقیقه بدون در، زیر هود قرار گرفت تا سطح محیط کشت خشک شود. سپس روی هر کدام از دیسک‌های سترون، ۱۵ میکرولیتر عصاره یا اسانس سرخارگل ریخته شد. از جنتامایسین ۱۰ میکروگرمی ساخت شرکت پادتن طب به عنوان شاهد مثبت و از دیسک حاوی ۲۰ میکرولیتر حلال خنثی دی متیل سولفوکسید به عنوان شاهد منفی استفاده شد. سه دیسک شامل شاهد مثبت، منفی و عصاره یا اسانس در سه تکرار روی محیط کشت قرار داده شدند. تشتک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر پس از طی دوره نگهداری اندازه‌گیری شد. آزمون زیست سنجی در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار با

[1] maceration
[2] dimethyl sulfoxide (DMSO)

نرم‌افزار SPSS ver. 16 تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ صورت پذیرفت.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد[1] و کشنده[2] عصاره و اسانس سرخارگل

در این آزمون از محیط کشت مایع مولر هینتون براث[3] (۲۱ گرم در لیتر) ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد برای تهیه غلظت اولیه عصاره سرخارگل از ۴۰ میلی‌گرم عصاره خشک در ۱ میلی‌لیتر حلال دی متیل سولفوکسید و برای اسانس ۱ و ۲ میکرولیتر اسانس هر کدام در ۲۰ میکرولیتر حلال استفاده شد. در بخش عصاره از نه لوله آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر و در مورد اسانس از هشت لوله آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر از محیط کشت استفاده شد. در هر دو بخش یکی از لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان شاهد مثبت حاوی فقط محیط کشت و باکتری و لوله آزمایش دیگر حاوی فقط محیط کشت به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. در عصاره‌ها هفت لوله آزمایش باقی مانده از شماره ۱ تا ۷ و شش لوله باقی مانده در مورد اسانس از ۱ تا ۶ شماره گذاری گردید. داخل لوله شماره ۱، ۱ میلی لیتر از عصاره سرخارگل با غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر و یا ۲۰ میکرولیتر از اسانس با غلظت ۲و۱ میکرولیتر ریخته شد، به وسیله ورتکس لوله به مدت یک دقیقه یکنواخت شد. از لوله آزمایش شماره ۱، مقدار ۱ میلی لیتر از محلول هموژن به وسیله سمپلر برداشته شده و داخل لوله شماره ۲ ریخته شد و این کار تا لوله شماره ۷ و برای اسانس تا لوله شماره ۶ تکرار شد و از لوله شماره آخر، ۱ میلی‌لیتر از محلول یکنواخت محیط کشت مایع و عصاره سرخارگل برداشته و به بیرون انتقال گردید بدین ترتیب غلظت‌های ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های قسمت‌های مختلف سرخارگل و غلظت‌های ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵و ۰/۰۶۲۵ میکرولیتر برای اسانس با غلظت ۲ میکرولیتر و غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵و ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲ میکرولیتر برای اسانس با غلظت ۱ میکرولیتر به‌دست آمد. سپس از سوسپانسیون باکتری تهیه شده مقدار ۲۰ میکرولیتر برداشته و داخل تمام لوله‌ها به جز لوله کنترل منفی ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری و سپس رشد یا عدم رشد باکتری‌ها به‌صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. مرز رقت بدون هیچ رشد قابل رؤیت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده از رشد در نظر گرفته شد و اولین لوله‌ای که نشان دهنده مهار رشد باکتری باشد به عنوان کمترین غلظت مهار کننده رشد در نظر گرفته شد. برای تعیین این که درون لوله‌ها رشد باکتری مهار شده یا از بین رفته به محیط کشت جامد مولر هینتون آگار انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنده در نظر گرفته شد.[۷]

نتایج و بحث تیمارهای مورد بررسی شامل اسانس گل و عصاره بخش‌های مختلف سرخارگل با حلال‌های مختلف اثرات بسیار معنی‌دار و متفاوتی بر رشد پرگنه باکتری مورد مطالعه داشتند (جدول ۱). هیچ یک از تیمارهای مورد بررسی از لحاظ آماری و عددی نتوانستند با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین که به عنوان شاهد مثبت استفاده شده بود، از نظر اثر بر این باکتری رقابت کنند. مؤثرترین تیمار شامل ۲ میکرولیتر از اسانس گل سرخارگل توانست با هاله بازدارنده ایجاد شده در جنتامایسین رقابت نزدیکی ایجاد نمود و با سایر تیمارهای مورد بررسی نیز اختلاف معنی‌داری نشان داد. تخفیف غلظت اسانس به نصف (۱ میکرولیتر) به طور معنی داری از اثر آن بر رشد باکتری کاست. اسانس گل سرخارگل از عصاره‌های

[1] minimal Inhibitive concentration (MIC)
[2] minimal bactericide concentration (MBC)
[3] Muller Hinton agar broth

جدول ۱- تجزیه واریانس قطر هاله بازدارندهٔ رشد ***X.a.* pv. *juglandis*** در اثر اعمال عصاره اندام‌های گیاهی و اسانس گل سرخارگل

Table1 – ANOVA of inhibition zone diameter in *X. a.* pv.*juglandis* colony affected by plant organs extracts and flower essential oils of coneflower

Source of variation	df	sum of square	mean of square	P value	
Treatment	23	2223.282	96.664	170.794	0.000
Error	48	27.167	0.566		
Total	71	2250.449			

C.V. (%) = 18.8%

غلظت ۱ میکرولیتر اسانس گل از لحاظ بازدارندگی رشد باکتری از دیدگاه آماری برابری کند. عصاره اتانولی ساقه و گل در رتبه بعدی از لحاظ بازدارندگی رشد باکتری قرار داشتند و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند. به نظر می‌رشد اتانول خلال موفق تری نسبت به سایرین در آزاد شدن مواد ضدباکتری از اندام‌های ریشه، گل و ساقه می‌باشد ولی در برگ با حلال متانول و استون از لحاظ آماری یکسان عمل نمود. نتایج نشان داد که مواد ضدباکتریایی در اندام‌های مختلف گیاهی از قبیل ریشه، ساقه، برگ و گل پراکنده اند و بر حسب حلال مورد استفاده مقادیر مختلفی از آنها استخراج می‌شود. آب تنها حلالی است که نتوانسته مواد ضدباکتریایی از اندام های گیاهی را استخراج کند و اثر عصاره‌های آبی در هیچ یک از اندام‌های مورد مطالعه با شاهد منفی معنی‌دار نیست. به نظر می‌رسد آب با این شیوه استخراج عصاره نتوانسته در آزاد نمودن مواد ضدباکتریایی موفق عمل کند. با این حال به نظر می‌رسد استفاده از برخی روش‌ها مثل جوشاندن در آب بتواند در این زمینه به استخراج مواد ضد میکروبی از گیاه بهتر عمل نماید. همچنین اسید کلریدریک در برگ و استون در گل و ساقه موفقیتی در رهاسازی مواد ضدباکتریایی نداشتند و اختلافشان با شاهد معنی‌دار نبود. استون در استخراج مواد ضد باکتریایی از ریشه و همچنین گل نیز موفقیت چندانی از خود نشان نداد و برای تهیه عصاره سرخارگل اصلاً حلال مناسبی به شمار نمی‌رود، در حالی که در استخراج این مواد از برگ و ساقه تا حدی موفق عمل کرد. استون یک حلال غیرقطبی است که احتمالاً نتوانسته در استخراج مواد

جدول ۲ – قطر هاله بازدارنده پرگنه ***X.a.* pv. *juglandis*** با اعمال عصاره اندام های مختلف و اسانس گل سرخارگل

Table 2 – Inhibition zone diameter in *X.a.* pv. *juglandis* colony affected by coneflower extracts and flower essential oils

Plant organ	solvent	inhibition zone diameter (mm)
Root	acetone	6.4 i
	ethanol	16.33 c
	methanol	11.33 ef
	water	6.40 i
	HCl	10.33 fg
Stem	acetone	9.33 gh
	ethanol	14.33 d
	methanol	10.33 fg
	water	6.40 i
	HCl	8.33 h
Leaf	acetone	10.33 fg
	ethanol	10.16 fg
	methanol	10.50 fg
	water	6.40 i
	HCl	6.40 i
Flower	acetone	6.40 i
	ethanol	14.66 d
	methanol	12.16 e
	water	6.40 i
	HCl	8.66 h
Flower essential oils (1 µl)		16.33 c
Flower essential oils (2 µl)		25.66 h
Gentamicin		27.00 a
Control		6.40 i

ضدمیکروبی موجود در عصاره گل و ریشه سرخارگل موفق عمل نماید. اتانول و متانول حلال مناسبی برای گل بودند ولی اسید کلریدریک هم حلال مؤثری بود در حالی که آب و استون برای عصاره‌گیری از گل مناسب نبودند. در کل، اسید کلریدریک در استخراج مواد ضدباکتری از قسمت‌های مختلف سرخار گل نسبت به آب و استون بهتر عمل نمود ولی باز از این نظر حلال ضعیفی به نظر می‌رسد که قادر به رقابت با متانول و اتانول نیست. متانول تنها در استخراج مواد ضدمیکروبی در برگ با اتانول رقابت کرد و از لحاظ آماری اثر یکسانی با آن داشت و در سایر اندام‌ها ضعیف‌تر از اتانول عمل نمود. در برگ، تنها حلال‌های اتانول، متانول و استون توانستند مواد ضدباکتری را از اندام‌های گیاهی آزاد نمایند در حالی که در این زمینه آب و اسید کلریدریک هیچ نوع موفقیتی نداشتند. عصاره‌های استون و اسیدکلریدریک ساقه از لحاظ اثر بر باکتری از لحاظ آماری بکسان عمل نمودند. عصاره استونی ساقه با عصاره متانولی از لحاظ آماری تأثیر یکسانی از خود نشان دادند. بهترین حلال به کار رفته برای استخراج مواد ضدباکتری از ساقه اتانول بود. اسیدکلریدریک در آزاد سازی مواد ضدباکتری در برگ بهتر از سایر اندام‌ها عمل نمود و حتی از لحاظ آماری با متانول توانست رقابت نماید (جدول ۲). نتایج بررسی حداقل غلظت کشنده و بازدارنده نشان داد که تمام عصاره ها و اسانس مورد مطالعه بر رشد باکتری بازدارنده اند ولی تنها تعدادی از آنها می‌توانند کشنده باشند. اسانس گل در هر دو غلظت بر باکتری مورد مطالعه کشنده بود. عصاره های آبی تنها بازدارنده بودند و در هیچ یک از اندام‌های گیاهی اثر کشندگی عصاره های آبی دیده نشد ولی اثر بازدارندگی در تمامی این اندام‌ها مشهود بود و این امر نشان می دهد که عصاره‌های آبی نیز می‌توانند بازدارنده باشند. همچنین عصـــاره برگی با حلال آب و اسید کلریدریک کشنده نبودند و اثر کشندگی عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های اتانول، استون و متانول نیز در غلظت‌های بالای ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. عصاره‌های اسیدکلریدریک کم اثرترین تیمارها از لحاظ باکتری ایستایی بودند و در تمامی اندام های مورد بررسی تنها در غلظت ۲/۵ میلی-گرم بر میکرولیتر توانستند از رشد باکتری تا حدی جلوگیری کنند. هیچ تیمار دیگری که از سایر حلال‌ها برای عصاره‌گیری آن استفاده شده بود اثر نشان نداد. مؤثرترین تیمار از لحاظ متوقف نمودن رشد باکتری اسانس تهیه شده از سرخارگل در غلظت‌های ۱ میکرولیتر بود که در غلظت ۰/۰۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست بازدارنده و در ۰/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر کشنده باشد. عصاره‌های اسیدکلریدریک در غلظت بسیار بالای ۲۰ و در ریشه ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست بر باکتری مورد مطالعه کشنده باشد. عصاره اتانولی و متانولی گل کشنده‌ترین تیمار عصاره‌ای مورد مطالعه بود که با اسانس‌ها توانست رقابت نماید (جدول ۳). *شولت و همکاران (۱۹۶۷)* نیز بر تجمع بیشتر مواد ضدباکتریایی در ریشه تأکید کرده‌اند.[۱۸] این مطالعه اثر مستقیم کشندگی و بازدارندگی مواد گیاهی استخراج شده از سرخارگل بر این باکتری را مورد تأیید قرار می‌دهد هرچند برخی محققین معتقدند سرخارگل با تأثیر روی سیستم ایمنی بدن موجب مقاومت بدن انسان برابر باکتری‌های بیماری‌زا می‌گردد .[۹،۱۹،۲۰]

نتیجه‌گیری نتایج این مطالعه نشان داد که سرخارگل به عنوان یک گیاه ضدمیکروبی از کارآیی بالقوه مناسبی برای مهار باکتری عامل بلایت گردو برخوردار است. تمام پیکره رویشی و زایشی گیاه از مواد ضدباکتریایی برخوردارند ولی تجمع مواد ضدمیکروبی در عصاره ریشه و نیز اسانس گل بیشتر است.

جدول ۳ –حداقل غلظت بازدارنده رشد و کشنده و نسبت غلظت کشنده به بازدارنده عصاره اندام‌های مختلف و اسانس گل سرخار گل بر ***X.a.* pv. *juglandis***

Table 3 – Minimal inhibitory and bactericide concentrations of *X.a.* pv. *juglandis* affected by coneflower extracts and flower essential oils

Plant organ	solvent	minimal inhibitory concentration (MIC) (mg/mL)	minimal bactericide concentration (MB) (mg/mL)	MBC/MIC
Root	acetone	1.25	-*	-
	ethanol	1.25	5.00	4
	methanol	1.25	5.00	4
	water	2.50	10.00	4
	HCl	0.75	-	-
Stem	acetone	1.25	10.00	8
	ethanol	1.25	5.00	4
	methanol	1.25	20.00	16
	water	2.50	-	-
	HCl	1.25	-	-
Leaf	acetone	1.25	10.00	8
	ethanol	1.25	10.00	8
	methanol	1.25	20.00	16
	water	2.50	-	-
	HCl	1.25	-	-
Flower	acetone	1.25	-	-
	ethanol	0.75	2.50	3.33
	methanol	1.25	2.50	2
	water	2.50	20.00	8
	HCl	0.75	-	-
Flower essential oils (1 µl)		0.625	0.50	4
Flower essential oils (2 µl)		0.125	0.25	4

* عدم تأثیر عصارها در هیچ کدام از غلظت‌های به کار رفته

* none of concentrations were effective on the bacterium

References

1. Afzal AM, Rahber-Bhatti MH and Aslam M. (1997). Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris* pv. *citri.* International Journal of Pest Management 43: 149-153.
2. Alishahi M, Mesbah M, Namjouyan P, Sabzvaryzadeh M and Razi-Jalali M. (2013). Comparison of the effects of some chemical and herbal immune stimulators on Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). Journal of Iranian Veterinary Medicine 8: 67-58.
3. Bany J, Siwicki AK, Zdanowska D, Sokolnicka I, Skopińska-Rózewska E and Kowalczyk M. (2003). *Echinacea purpurea* stimulates cellular immunity and anti-bacterial defence independently of the strain of mice. Journal of Veterinary Science 6: 3-5.
4. Buchner RP, Olson WH and Adaskaveg, JE. (2001). Walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) control investigations in Northern California, USA. Acta Hort. (ISHS) 544:369-378.

5. Cowan MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12: 564–582.
6. Hassanzadeh N. 2005. Technology of natural plant materials, emphasizing on fire blight disease. Agricultural Science 11: 58-53.
7. Izadi Z, Soroushzadeh A, Modarre Sanavi SAM, Esna-Ashari, M and Davoudi P. (2012). Identify the chemical composition of the essential oil of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) and evaluation of its antimicrobial activity against a number of bacterial strains. Southern Medical Journal. 12 pp.
8. 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 doi: 10.1111/ppa.12211.
9. Lee TT, Huang CC, Shieh XH, Chen CL, Chen LJ and Yu B. (2010). Flavonoid, phenol and polysaccharide contents of *Echinacea purpurea* L. and its immunostimulant capacity in vitro. International Journal of Environment and Sustainable Development .1: 5-9.
10. Merali S, Binns S, Paulin-Levasseur M, Ficker C, Smith M, Baum B, Brovelli E. and Arnason JT. (2003). Antifungal and anti-inflammatory activity of the genus Echinacea. Pharmaceutical Biology 41: 412-20.
11. Narayanasamy PN. (2002). Microbial plant pathogens and crop disease management. Science Publishers: USA. 572 p.
12. O'Hara M, Kiefer D, Farrel K and Kemper K. (1998). A review of 12 commonly used medicinal herbs. Archives of Family Medicine.7: 523-535.
13. Omidbeigi, R. (2010). Processing of medicinal plants. First edition, Astane Qodse Razavi Publisher. 423 pp.
14. 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.
15. Rudolph, BA. (1933). Bacteriosis of English walnut in California and its control. California Agricultural Experimental Station Bulletin 564: 3-88.
16. Sabouri Z, Barzegar M, Sahari MA, Naghdi Badi H. (2012). Antioxidant and antimicrobial potential of *Echinacea purpurea* extract and its effect on extension of cake shelf life. Journal of Medicinal Plants 11:28-40.
17. Savage TF, Cotter PF and Zakrzewska EI. (1996). The effect of feeding mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of Wrolstad MW male turkeys. Poultry Science 75: 143-148.
18. Schulte KE, Rucker G and Perlick J. (1967). The presence of polyacetylene compounds in *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* DC. Arzneimittelforschung, 17: 825-829.
19. Sharma SM, Anderson M, Schoop SR and Hudson JB. (2010). Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized Echinacea extract (Echinaforce): dual actions against respiratory bacteria. Phytomedicine 17: 563-568.
20. Sloley BD, Urichuk LJ, Tywin C, Coutts RT and Shan JJ. (2001). Comparison of chemical components and antioxidant capacity of different *Echinacea* species. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. 53: 849-857.
21. Strange RN and Scott PR. (2005). Plant disease: a threat to global food security. Annual Review of Phytopathology, 43: 83-116.
22. 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.

Antibacterial effect of flower essential oils and plant organs' extracts of purple coneflower on the bacterium *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

Modern Science of Sustainable Agriculture Journal
Vol. 10, No. 2, (11-19)

Soleiman Jamshidi *
Islamic Azad University
Miyaneh Branch
Young Researchers and Elite Club
Miyaneh, Iran
E-mail ✉: s.jamshidi@m-iau.ac.ir
(corresponding author)

Soudabeh Andargani
M.Sc. of Horticulture
Science Department
Islamic Azad University
Miyaneh Branch
Miyaneh, Iran
E-mail ✉:
soudabehandargani92@gmail.com

Mehdi Oraei
Assistance professor of
Horticulture Science Department
Islamic Azad University
Miyaneh Branch
Miyaneh, Iran
E-mail ✉: moraei@yahoo.com

Received: 02 May, 2014 **Accepted:** 28 July, 2014

ABSTRACT Recently, there is an increasing attention to plant pathogen's biocontrol considering hazards and environmental threats of chemical pesticides. Therefore, using plant materials as safe and natural antimicrobes is going to be investigated in recent years. The current study's projective was evaluation of plant materials obtained from purple coneflower effecting on *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* bacterial walnut blight agent. Aqueous, methanol, ethanol, acetone and HCl extracts of coneflower root, stem, leaf and flower were extracted by rotary set and flower essential oils using clevenger apparatus. The antimicrobial activity of coneflower extracts and essential oil was evaluated in laboratory with disc diffusion and minimal inhibitory and bactericide concentration methods. The bacterium was more sensitive to flower essential oil than extracts. Ethanol acted successfully in antimicrobial material release from plant organs. Also, aqueous extract and also HCl and acetone extracts had very limited antibacterial activities on studied bacterium. All plant extracts and essential oils were inhibitive on bacterium. Leaf extract were more inhibitive than bactericide. Regarding the results plant materials obtained from coneflower could be a remarkable potential against walnut blight bacterium and might be considered as a promising biocontrol agent in the future.

Keywords:
- *Echinacae purpurea*
- Biocontrol
- Antibacterial property
- natural products
- plant disease management
- walnut blight