مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان، ۱۳۹۷

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانتی عصاره های متانولی و کلروفرمی گیاهان دارویی اُکالیپتوس، زوفا و اقاقیا

زهرا حدادی[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده*[۲]، سمیه قهاری[۳]

چکیده

گیاهان دارویی، امروزه به طور گسترده به عنوان جایگزینی برای آفت‌کش‌های شیمیایی سنتزی مطرح هستند. در این پژوهش ترکیبات شیمیایی اسانس و اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانتی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی گیاهان دارویی اُکالیپتوس، زوفا و اقاقیا روی پاتوژن‌های مهم گیاهی که معمولاً باعث آسیب‌های غیر قابل جبران به محصولات کشاورزی می‌شوند، مورد بررسی قرار گرفته‌اند. جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس‌های بدست آمده، با استفاده از دستگاه GC/MS انجام شد. فعالیت ضد میکروبی بر روی ۱۱ میکروارگانیسم از جمله؛ سه باکتری گرم مثبت، پنج باکتری گرم منفی و نیز سه گونه قارچ با استفاده از روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، فعالیت آنتی اکسیدانتی این سه گیاه با اندازه‌گیری آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و ارزیابی میزان توانایی به دام اندازی رادیکال DPPH سنجیده شدند. علاوه بر این، میزان فنول و فلاونوئید کل گیاهان یاد شده نیز اندازه‌گیری گردیدند. بر اساس نتایج به دست آمده، در بین عصاره‌های متانولی و کلروفرمی، بیشترین فعالیت ضد باکتریایی به ترتیب مربوط به برگ گیاه زوفا و برگ گیاه اقاقیا بوده است. اسپاتولنول، فیتول و اسپاتولنول به ترتیب عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس گیاهان اُکالیپتوس، اقاقیا و زوفا بودند. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های این سه گیاه می‌توانند به عنوان کاندیدای مناسبی جهت بررسی‌های بیشتر در شرایط نیمه مزرعه‌ای و مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرند تا در صورت تأیید قدرت باکتری‌کشی آن‌ها در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات در کنترل آفات و بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: اسانس، عصاره گیاهی، فعالیت ضد باکتریایی، اثر ضد قارچی، فعالیت آنتی اکسیدانتی

---

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۲] استاد پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، نویسنده مسئول، ایمیل: gh.nematzadeh@gmail.com

[۳] پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

از زمانی‌که انسان مبادرت به کشاورزی نمود، همواره با خسارات وارد شده توسط عوامل خسارت‌زای گیاهی شامل آفات و بیماری‌های گیاهی روبرو بوده است (Brader, 1979). روش‌های اولیه‌ی کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی همچون روش‌های کشاورزی، ابتدایی بوده است و به دنبال پیشرفت‌های شگرفی که در کشاورزی رخ داد، روش‌های کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی نیز شاهد پیشرفت‌های گسترده‌ای بود (Brader, 1979). امروزه یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی، استفاده از ترکیبات شیمیایی سنتزی می‌باشد (Farahani et al., 2018). مصرف بی‌رویه و عدم رعایت اصول کاربرد این ترکیبات، از یک طرف، منجر به بروز پدیده‌ی مقاومت در آفات و امراض نسبت به این ترکیبات شده و از طرف دیگر، موجب بروز آلودگی‌های زیست محیطی و مسمومیت موجودات غیر هدف گردید (Gurjar et al., 2012; Farahani et al., 2018). بنابراین، یافتن روش‌های جایگزین این ترکیبات که ضمن دارا بودن توانایی مطلوب در کنترل عوامل زنده‌ی خسارت‌زا، برای محیط زیست و موجودات غیر هدف از جمله؛ انسان، دام و دشمنان طبیعی ایمن باشند، بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران عرصه‌ی کنترل آفات قرار گرفته است (Isman, 2006). مطالعات انجام شده نشان داده است که گیاهان در برابر آفات و بیماری‌های گیاهی دارای نوعی دفاع شیمیایی می‌باشند که توسط ترکیباتی موسوم به متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی ایجاد می‌شوند (Isman, 2006). این ترکیبات برخلاف متابولیت‌های اولیه نظیر؛ کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و غیره، به خودی خود در مراحل مختلف رشد گیاه تأثیر ندارند، بلکه در دفاع از گیاهان در برابر گیاهخواران و بیمارگرها مؤثر می‌باشند (Ismanand and Machial, 2006). به دنبال شناخت این ویژگی‌ها در گیاهان، محققان به دنبال استخراج ترکیبات ثانویه‌ی دفاعی گیاهان و استفاده از آن‌ها در کنترل عوامل خسارت‌زای گیاهی رفتند (Ismanand and Machial, 2006). در این راستا، پژوهشگران زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه‌ی اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد حشره‌کشی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی که جزء متابولیت‌های ثانویه هستند، پرداخته‌اند (Alam et al., 2012).

رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی با الکترون جفت نشده هستند و به طور معمول می‌توانند همه‌ی انواع مولکول‌های زیستی نظیر؛ اسیدهای نوکلئیک، پروتئین-ها، اسیدهای آمینه، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها را مورد هجوم قرار دهند (Arora et al., 2002). گیاهان مسیرهای آنتی اکسیدانی تکامل یافته‌ای دارند که معمولاً برای حفاظت آن‌ها از آسیب اکسیداتیو در طول رشد طبیعی و تنش‌های متوسط کافی می‌باشد. سیستم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی از بافت گیاه در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در اثر تنش-های محیطی خارجی نظیر سرما، خشکی و آلودگی هوا محافظت می‌نمایند (Kang and Saltveit, 2001).

اُکالیپتوس گیاهی از خانواده Myrtaceae است که در مناطق گرمسیری می‌روید. برگ اُکالیپتوس به دلیل وجود تانن که ترکیبات پلی فنلی می‌باشند، دارای خواص ضد باکتریایی و ضد ویروسی است (Cowan, 1999). وجود اثرات ضد قارچی در اسانس اندام‌های هوایی اُکالیپتوس به اثبات رسیده است (Shariff et al., 2006). عبدالملکی و همکاران (۱۳۸۸)، اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی اندام‌های هوایی گیاه اُکالیپتوس را علیه قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه (*Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Phytophthora dershleri* و *Bipolaris sorokiniana*) مورد بررسی قرار دادند.

عصاره‌ی متانولی اندام هوایی گیاه اُکالیپتوس بیشترین فعالیت ضد قارچی را نشان داد.

گیاه اقاقیا متعلق به خانواده‌ی Fabaceae می‌باشد. ویتچ و همکاران (۲۰۱۰)، ترکیبات اصلی تشکیل دهنده‌ی عصاره‌ی برگ گیاه اقاقیا را شناسایی نمودند که شامل فلاونوئیدهایی نظیر؛ robinin، acacetin-7-O-rutoside، apigenin، diosmetin، luteolin، secundiflorol، mucronulatol، isomucronulatol و isovestitol می‌باشد که مشخص گردید که، این ترکیبات نقش مهمی در داروسازی دارند. کامدن و همکاران (۱۹۹۴)، ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس برگ اقاقیا (*Robinia pseudoacacia*) را شناسایی نمودند. دلتا-۳-کارن[۱] و لینالول[۲] عمده‌ترین ترکیبات اسانس بوده است. در مطالعه‌ی دیگر، جولیان (۱۹۸۶)، آمینوبنزآلدئید[۳]، متیل آنترانیلات[۴] و لینالول را به عنوان اجزای اصلی اسانس برگ اقاقیا شناسایی نمود. مشخص گردید که، این ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی می‌باشند (Tian et al., 2001). خوش خلق و همکاران (۱۳۹۰)، اثر ضد قارچی عصاره‌ی متانولی برگ‌های گیاه اقاقیا را روی قارچ گونه‌ی *Candida albicans* سنجیدند. این محققان نشان دادند که، عصاره‌ی به دست آمده از برگ‌های این گیاه حاوی آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی می‌باشد که هر یک از این ترکیبات به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر در پژوهش‌های مختلف اثر ضد قارچی نشان داده‌اند.

گیاه زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* متعلق به خانواده Lamiaceae است. حسن شاهیان و همکاران (۲۰۱۹)، 2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxylmethyl) را به عنوان عمده‌ترین ترکیب فعال و مؤثره‌ی موجود در عصاره‌ی اندام هوایی گیاه زوفا شناسایی نمودند. همچنین، این محققان نشان دادند که، عصاره‌های اتانولی و متانولی اندام هوایی گیاه زوفا اثرات ضد میکروبی بالایی روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی دارند.

هدف از این تحقیق علاوه بر شناسایی ترکیبات اسانس گیاهان دارویی اُکالیپتوس، زوفا و اقاقیا به وسیله‌ی دستگاه GC/MS، بررسی فعالیت‌های ضد باکتریایی (بر روی سه باکتری گرم مثبت؛ باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و راتایی باکتر توکسیکوس و پنج باکتری گرم منفی؛ اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس سیرینگه، سودوموناس ویریدی فلاوا و زانتوموناس کمپستریس)، ضد قارچی (علیه پریکولاریا اُریزا، بوتریتیس سینره و فوزاریوم اُکسیسپروم) و آنتی اکسیدانتی (سنجش کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، DPPH، فنول کل و فلاونوئید کل) این سه گونه‌ی گیاهی بوده است.

---

[۱] Delta 3- carene
[۲] Linalol
[۳] Amino benzaldehyde
[۴] Methyl anthranilate

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی نمونه‌های گیاهی

در پژوهش حاضر ۳ گونه‌ی گیاهی اُکالیپتوس (برگ)، زوفا (اندام هوایی) و اقاقیا (برگ) در مهر ماه سال ۱۳۹۶ از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (مازندران) واقع در 685032 ME40595542MN 39S جمع‌آوری و به آزمایشگاه فیتوشیمی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان منتقل و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر در سایه و به دور از نور مستقیم خورشید خشک و سپس هر یک از اندام‌های مورد نظر، برای عملیات اسانس‌گیری و عصاره‌گیری با آسیاب برقی پودر شدند.

استخراج عصاره‌ی گیاهی

عصاره‌ی متانولی و کلروفرمی گونه‌های گیاهی مورد نظر به روش ماسراسیون تهیه گردیدند. جهت عصاره‌گیری از گیاهان، به ۱۰۰ گرم از هر یک از نمونه‌های گیاهی حدود ۸۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق توسط شیکر با هم مخلوط شدند تا عصاره‌گیری انجام شود. سپس عصاره‌های حاصل صاف و با دستگاه تبخیر کننده‌ی دوار در خلاء[1] با حرارت ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تغلیظ گردیدند. عصاره‌های تغلیظ شده با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر (ساخت شرکت ساتریوس آلمان) استریل شدند. در عصاره‌گیری با کلروفرم روش کار مشابه با استخراج با متانول انجام شد. در نهایت، عصاره‌های تهیه شده به درون ظروف شیشه‌ای تیره منتقل و در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (Ghahari et al., 2015).

استخراج اسانس

اسانس گیاهان مورد مطالعه به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر در مدت زمان ۴ ساعت استخراج شدند. برای چنین کاری از ۷۰ گرم از گیاه آسیاب شده استفاده گردید. برای آبگیری از سدیم سولفات بدون آب استفاده گردید. سپس اسانس‌های بدست آمده تا زمان آنالیز در یک ظرف تیره و در یخچال (دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس‌های بدست آمده، با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) انجام شد.

اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) (Agilent Technologies 7890A) متصل به طیف سنج جرمی (Agilent Technologies 5975C) و ستون HP-5MS (۳۰ متر × ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) تزریق و شرایط مناسب برای بهترین جداسازی بدست آمد. بر این اساس دمای آون ابتدا با سرعت ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بر دقیقه از دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به ۲۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت و ۷ دقیقه در این دما باقی ماند. در ادامه با سرعت ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بر دقیقه به ۲۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد افزایش یافت. دمای محیط تزریق و آشکارساز به ترتیب در ۲۸۰ و ۲۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم گردید. همچنین از هلیوم (با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه) به عنوان گاز حامل استفاده گردید. با توجه به سطح زیر منحنی کروماتوگرام GC، درصد اجزای اسانس بدست آمد.

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

تهیه‌ی عصاره‌ی آنزیمی

۰/۰۵ گرم از بافت فریز شده‌ی گیاهان مورد نظر در هاون چینی سرد و در ظرف یخ با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته‌ی ۶/۸ حاوي EDTA یک میلی‌مولار هموژن و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در

[1] Rotary Evaporator

۱۷۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیـد. فاز بالایی (سوپرناتانت) عصاره‌ی بدست آمده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، و مقدار پروتئین‌های محلول مورد استفاده قرار گرفت (Kar and Mishra, 1976; Liu and Huang, 2000).

اندازه‌گیري فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز با روش اسـپکتروفتومتري و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در مدت ۶۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیري شد. مخلوط واکنش حاوي بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۶/۸)، آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی می‌باشد. با اضافه نمودن عصاره به محیط واکنش، تجزیه‌ی H_2O_2 توسط آنزیم شروع می‌شود (Chance and Maehly, 1955).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز با روش اسـپکتروفتومتري در مدت ۶۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰ نانومتر صورت گرفت. معرف مورد نیاز برای فعالیت آنزیم، گایاکول می‌باشد که در حضور الکترون‌های ناشی از تجزیه‌ی H_2O_2 به وسیله‌ی آنزیم به تتراگایاکول تبدیل می‌شود و رنگ قرمز تولید می‌نماید. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH = ۶/۸)، گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۴۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد (Chance and Maehly, 1955).

اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول

برای اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسید و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه گردید. بعد از ورتکس نمودن و گذشت ۱۵ دقیقه جذب ترکیب فوق با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

تعیین فعالیت ضد رادیکالی با استفاده از DPPH

یک میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰-۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، با یک میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۱۳۵ میلی‌مولار از DPPH مخلوط گردیدند. محلول-های حاصل به سرعت هم زده شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفتند و پس از آن جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شدند. نمونه شاهد شامل یک میلی‌لیتر DPPH و یک میلی‌لیتر متانول است. از اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد استفاده گردید. این آزمایش برای هر غلظت سه بار تکرار گردید. سپس ظرفیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌ها به صورت درصد به دام اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از معادله‌ی زیر محاسبه شد:

$$DPPH\% = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

همچنین میزان IC_{50} (غلظتی از هر عصاره که لازم است تا ۵۰% رادیکال‌ها مهار شوند) برای عصاره‌ها تعیین گردید (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2005).

تعیین میزان فنول کل

اندازه‌گیری میزان فنول گیاهان مورد نظر با استفاده از روش فولین - سیو کالتو انجام شد (Yu et al., 2002). به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی متانولی سانتریفیوژ شده‌ی گیاه (غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۹۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و سپس ۵۰۰ میکرولیتر واکنشگر فولین - سیو کالتو اضافه و به خوبي مخلوط

گردیدند. بعد از پـنج دقیقـه، ۱/۵ میلی‌لیتر کربنـات سـدیم ۲۰ درصد اضافه و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. پس از آنکه نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق هم زده شدند، میزان جذب نور هر عصاره به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر در طـول مـوج ۷۲۵ نـانومتر نسبت به شاهد انـدازه‌گیري گردید. براي تهیه‌ی منحني استاندارد از اسید گالیك استفاده شـد. در نهایت میزان فنول کل از روی میزان جذب نمونه و استاندارد، بر حسب میلی‌گرم اسید گالیـك به گرم وزن خشک گیاه بیان گردید.

تعیین میزان فلاونوئید کل

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از روش رنگ-سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002). به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی متانولی سانتریفیوژ شده‌ی گیاه (غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در شرایط تاریکی و در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقایسه با شاهد انـدازه‌گیري گردیدند. براي تهیه‌ی منحني استاندارد از کوئرستین استفاده شـد. در نهایت میزان فلاونوئید کل از روی میزان جذب نمونه و استاندارد بر حسب میلی-گرم کوئرستین به گرم وزن خشک گیاه بیان گردید.

بررسی فعالیت ضد باکتریایی

فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی گونه‌های گیاهی مورد آزمایش بر روی سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و راتایی باکتر توکسیکوس) و پنج باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس سیرینگه، سودوموناس ویریدی فلاوا و زانتوموناس کمپستریس) بر اساس روش پیشنهادی کیربی - باور مورد بررسی قرار گرفتند (قهاری و همکاران، ۱۳۹۵). دیسک‌های کاغذی به قطر ۶ میلی‌متر تهیه و استریل شدند. دیسک‌ها را با ۲۵ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف تهیه شده از هر عصاره‌ی گیاهی (۰/۵۰، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ ppm) آغشته و با پنس بر سطح آگار محیط کشت آغشته با سوسپانسیون میکروبی قرار داده و به آرامی به سمت پایین فشار داده تا دیسک کاملاً با سطح آگار تماس حاصل کند. پتری دیش‌ها برای سویه‌های استاندارد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای باکتری‌های گیاهی در حرارت ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت زمان مورد نظر قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از کولیس بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شدند. برای باکتری‌های استاندارد از آنتی-بیوتیک‌های شناخته شده‌ی جنتامایسین (µg/disc ۱۰) و کلرامفنیکل (µg/disc ۳۰) و برای باکتری‌های گیاهی از استرپتومایسین سولفات (µg/ml ۱۰) به عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکسید و دیسک خالی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. فعالیت‌های ضد باکتریایی در چهار تکرار، با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) در سطح پلیت‌ها و با نرم افزار اکسل و به صورت میانگین ± انحراف معیار مورد بررسی قرار گرفتند.

سنجش فعالیت ضد قارچی

فعالیت ضد قارچی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی گونه‌های گیاهی مورد آزمایش با استفاده از روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای رشد و تکثیر قارچ‌ها از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA) استفاده گردید. دیسک‌های کاغذی به قطر ۶ میلی‌متر تهیه و استریل شدند. دیسک‌ها را با ۲۵ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف تهیه شده از هر عصاره‌ی گیاهی

(۰/۵۰، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ ppm) آغشته و با پنس بر سطح آگار پتری دیش قرار داده و به آرامی به سمت پایین فشار داده تا دیسک کاملاً با سطح آگار تماس حاصل کند. با تیغ استریل هیف قارچ را در اندازه‌های یکسان برش داده و برش‌ها را با لوپ برداشته و به صورت برعکس در وسط پتری دیش‌ها قرار داده و سپس پتری دیش‌ها در انکوباتور با رطوبت نسبی بالای ۷۰ درصد و دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۴-۱۲ روز برای قارچ پریکولاریا اُریزا و ۹-۷ روز برای قارچ‌های فوزاریوم اُکسیسپروم و بوتریتیس سینره قرار داده شدند تا وضعیت رشد قارچ‌ها مشخص گردد. از DMSO به عنوان کنترل منفی و از پتری دیش حاوی پاتوژن و بدون عصاره به عنوان شاهد استفاده گردید (Ghahari et al., 2015;17a,b; 18).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 22 انجام و مقایسه میانگین‌ها نیز به روش دانکن انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2013 انجام شد.

نتایج

آنالیز و شناسایی کمی و کیفی اجزای موجود در اسانس

برگ اقاقیا

اسانس برگ اقاقیا در شرایط بهینه و با استفاده از برنامه‌ریزی دمایی به دستگاه GC/MS تزریق گردید. پس از تزریق، کروماتوگرام‌های گازی و طیف‌های جرمی اجزای تشکیل دهنده‌ی اسانس به دست آمد که پس از محاسبه‌ی ضرایب بازداری مواد تشکیل دهنده‌ی و مقایسه‌ی طیف‌های جرمی ترکیبات مجهول با ترکیبات استاندارد، ترکیبات متشکله‌ی موجود در اسانس و میزان آن‌ها مشخص گردید. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌گردد، ۱۳ ترکیب از مقایسه‌ی ضرایب بازداری و طیف جرمی‌شان با ترکیبات استاندارد شناسایی شدند. فیتول (۶۴/۷۸%)، n-هگزادکانوییک اسید (۱۰/۴۱%)، و تریکوزان (۴/۷۰%) مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده‌ی اسانس برگ اقاقیا می‌باشند.

اندام هوایی زوفا

اسانس اندام هوایی زوفا در شرایط بهینه و با استفاده از برنامه‌ریزی دمایی به دستگاه GC/MS تزریق گردید. همانگونه که در جدول ۲ ملاحظه می‌گردد، ۲۹ ترکیب از مقایسه‌ی ضرایب بازداری و طیف جرمی‌شان با ترکیبات استاندارد شناسایی شدند. اسپاتولنول (۲۰/۵۴%)، n- هگزادکانوییک اسید (۸/۲۸%)، و ۹، ۱۲، ۱۵- اکتادکاتری‌انال (۷/۵۷%) مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده‌ی اسانس اندام هوایی زوفا می‌باشند.

جدول ۱- ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس اقاقیا، آنالیز به کمک دستگاه GC/MS

Compound	Rt (min)	Area %
1-Octen-3-one	۳/۹۷۴	۰/۷۹
Terpinolene	۵/۲۱۹	۱/۵۱
Alloaromadendrene	۸/۷۳۱	۱/۴۹
(+) Spathulenol	۹/۶۸۷	۲/۹۲
Neophytadiene	۱۱/۴۳۹	۱/۰۱
6,10-dimethylundecan-2-one	۱۱/۴۹۳	۱/۰۳
Ethyl linoleate	۱۱/۸۹۳	۱/۴۵
Hexadecanoic acid, methyl ester	۱۲/۰۸۶	۰/۹۷
n-Hexadecanoic acid	۱۲/۳۸۷	۱۰/۴۱
Phytol	۱۴/۰۰۷	۶۴/۷۸
Linoleic acid	۱۴/۲۲۶	۳/۹۹
Linolenyl alcohol	۱۴/۳۱۶	۴/۱۲
Tricosane	۱۶/۹۰۹	۴/۷۰
Total identified		**۹۹/۱۷**

برگ اُکالیپتوس

اسانس برگ اُکالیپتوس در شرایط بهینه و با استفاده از برنامه‌ریزی دمایی به دستگاه GC/MS تزریق گردید. همانگونه که در جدول ۳ نشان داده شده است، ۲۲ ترکیب از مقایسه‌ی ضرایب بازداری و طیف جرمی‌شان با ترکیبات استاندارد شناسایی شدند. اسپاتولنول (۵۱/۵۱%)، کومین آلدهید (۴/۵۳%)، و پارا سیمن (۴/۴۹%) مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده‌ی اسانس برگ اُکالیپتوس می‌باشند.

جدول ۲- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زوفا، آنالیز به کمک دستگاه GC/MS

Compound	Rt (min)	Area %
Furan, 2-pentyl-	۴/۱۳۵	۰/۵۰
Decane	۴/۱۹۷	۰/۹۴
5-Ethyl-*m*-xylene	۴/۵۰۲	۰/۳۰
dl-Limonene	۴/۵۵۱	۰/۴۹
Nonanal	۵/۲۶۹	۰/۴۱
Thymol	۷/۰۸۶	۲/۹۶
1,2-dihydro-1,1,6-tri methyl naphthalene	۷/۷۵۸	۰/۴۳
Tetradecane	۸/۰۲۶	۰/۲۷
β-Caryophyllene	۸/۳۷۷	۱/۲۹
6,10-Dimethyl-5,9-undecadien-2-on	۸/۵۱۷	۴/۰۷
Alloaromadendrene	۸/۷۳۱	۶/۶۸
β-Ionone	۸/۸۶۷	۱/۰۱
Dodecanoic acid	۹/۳۵۴	۰/۳۸
(+) Spathulenol	۹/۶۸۷	۲۰/۵۴
(+)-Aromadendrene	۹/۷۴۹	۱/۹۷
Naphthalene	۹/۹۰۶	۰/۸۲
Decahydro-1,4-methanobenzocyclodecene	۱۰/۱۴۱	۰/۶۸
Heptadecane	۱۰/۴۲۹	۰/۷۰
Tetradecanoic acid	۱۰/۸۶۲	۱/۵۰
Octadecane	۱۱/۱۵۱	۰/۵۵
6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	۱۱/۴۸۹	۳/۹۶
Diisobutyl phthalate	۱۱/۷۱۵	۴/۶۱
n-Hexadecanoic acid	۱۲/۳۷۵	۸/۲۸
Dibutyl phthalate	۱۲/۴۸۲	۳/۵۶
Ethyl palmitate	۱۲/۶۶۸	۱/۰۵
Neophytadiene	۱۳/۹۷۸	۶/۷۲
Linoleic acid	۱۴/۲۱۷	۲/۴۷
9,12,15-Octadecatrienal	۱۴/۳۱۶	۷/۵۷
Ethyl Linoleolate	۱۴/۳۷۴	۳/۱۲
Total identified		**۸۷/۸۳**

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانتی

تعیین کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و پروتئین

کاتالاز و گایاکول پراکسیداز از آنزیم‌های اصلی سیستم دفاعی آنتی اکسیدان گیاهان می‌باشند که از بافت گیاهان در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در اثر تنش‌های محیطی خارجی نظیر سرما، خشکی و آلودگی هوا محافظت می‌نمایند. بنابراین هر چه میزان این آنزیم‌ها در گیاه بیشتر باشد نقش مؤثرتری در تبدیل اکسیژن‌های فعال نظیر $O_2^{-\cdot}$ و $OH^{\cdot}$ به رادیکال-های غیرفعال اکسیژن نظیر اکسیژن مولکولی ایفا می-نمایند. در این پروژه فعالیت این دو آنزیم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۴ گزارش شده است. همچنین مقدار پروتئین موجود در گیاهان مورد آزمایش با استفاده از سرم آلبومین گاوی تعیین گردید. از میان گیاهان مورد آزمایش اندام هوایی زوفا و برگ اُکالیپتوس به ترتیب دارای بیشترین مقدار کاتالاز و گایاکول پراکسیداز می‌باشند. همچنین دانه‌ی گیاه زوفا دارای بالاترین مقدار پروتئین بود.

جدول ۳- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس اکالیپتوس، آنالیز به کمک دستگاه GC/MS

Compound	Rt (min)	Area %
α-Phellandrene	۴/۲۷۹	۰/۶۳
α-Terpinene	۴/۴۰۳	۰/۷۰
p-Cymene	۴/۴۸۵	۴/۴۹
Sabinene	۴/۵۵۱	۱/۳۸
γ-Terpinene	۴/۸۳۲	۱/۰۶
alpha, 2-dimethyl styrene	۵/۱۴۹	۰/۵۲
Terpinen-4-ol	۶/۰۶۸	۲/۰۷
Benzenemethanol, α,α,4-trimethyl-	۶/۱۲۶	۰/۵۵
4-(1-methylethyl)-2-cyclohexen-1-one	۶/۱۸۰	۴/۲۹
4-Isopropylphenol	۶/۴۸۰	۰/۶۹
Cuminaldehyde	۶/۶۸۷	۴/۵۳
(S)-Phellandral	۷/۰۳۷	۴/۱۵
Thymol	۷/۰۹۱	۲/۰۰
4-Isopropylbenzyl Alcohol	۷/۱۳۲	۱/۷۶
Carvacrol	۷/۱۹۴	۲/۰۶
Alloaromadendrene	۸/۷۳۵	۱/۹۶
1-But-2-enyl-2,3-dimethylbenzene	۸/۹۵۴	۱/۶۳
(+)-Aristol-9-ene	۹/۵۶۰	۰/۸۶
(-)-Spathulenol	۹/۷۴۵	۵۱/۵۱
(+)-Cuparene	۹/۸۶۵	۰/۷۰
alpha-Guaiene	۹/۹۱۸	۱/۵۷
β-Oplopenone	۱۰/۳۶۸	۰/۹۹
Total identified		**۹۰/۱۰**

جدول ۴- تعیین کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و پروتئین

نام گیاه	کاتالاز[الف]	گایاکول پراکسیداز[ب]	پروتئین[ج]
برگ اقاقیا	۰/۴۵۹	۲/۳۲۲	۵/۲۲۰
اندام هوایی زوفا	۰/۸۶۶	۲/۴۰۸	۳/۳۷۸
برگ اُکالیپتوس	۰/۱۷۷	۴/۵۳۴	۳/۳۱۱

الف- µmole activity/min، ب- mmol activity /min، ج-mg/g dry weight

تعیین فعالیت ضد رادیکالی با استفاده از DPPH

هر چه غلظت آنتی اکسیدان گیاه بیشتر باشد، تغییر رنگ از ارغوانی به زرد بیشتر بوده و فعالیت آنتی - اکسیدانتی بیشتر است. جذب غلظت‌های مختلف (۴۰- ۲۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره‌ی متانولی گیاهان مورد آزمایش در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شدند. سپس این جذب‌ها در معادله‌ی مربوطه قرار گرفتند تا ظرفیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌ها به صورت درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH محاسبه شوند. از آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد استفاده گردید. واکنش‌ها وابسته به غلظت عصاره‌ها بوده و در مقادیر بالاتر از ۵۰ درصد بازدارندگی به صورت منحنی نمایش داده می‌شود. بنابراین فقط غلظت‌هایی را که تا این مقدار فعالیت مهارکنندگی دارند به صورت IC_{50} گزارش می‌دهند. نتایج حاصل از این بررسی‌ها در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵- فعالیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌ها بر اساس درصد مهار رادیکال DPPH

نام گیاه	اندام مورد بررسی	IC_{50} (µg/ml)
اقاقیا	برگ	۶/۱۷ ± ۱/۲
زوفا	اندام هوایی	۵/۹۵ ± ۰/۸
اُکالیپتوس	برگ	۶/۳۶ ± ۱/۴۳

همانطور که در جدول ۵ نشان داده شده است، از بین گیاهان مورد آزمایش، اندام هوایی زوفا با IC_{50} = ۵/۹۵ ± ۰/۸ µg/ml دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانتی می‌باشد.

تعیین فنول

روش فولین - سیو کالتو روشی مناسب برای تعیین مقدار فنول کل در عصاره‌ها می‌باشد. این واکنشگر از طریق واکنش با فنول‌ها کاهش یافته و رنگ محلول از زرد به آبی تبدیل می‌شود. در این صورت می‌توان با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر، شدت جذب محلول‌ها را اندازه‌گیری نمود. جهت تعیین مقادیر فنول کل از استاندارد گالیک اسید استفاده گردید و مقادیر فنول کل به صورت میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گیاه بیان شدند. بر اساس

مقادیر جذب مربوط به غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی و مقایسه‌ی آن‌ها با محلول استاندارد گالیک اسید، نتایج در جدول ۶ آورده شده است. داده‌ها مربوط به سه تکرار می‌باشند. نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌ی متانولی یک منبع غنی از ترکیبات فنولی است. این نتیجه قابل مقایسه با نتایج سایر بررسی‌های انجام شده در این زمینه می‌باشد (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007; Sultana et al., 2007). همانطور که در جدول ۶ نشان داده شده است، برگ اقاقیا دارای بیشترین محتوای فنول کل می¬باشد.

جدول ۶- مقادیر فنول کل گیاهان مورد آزمایش

نام گیاه	اندام مورد بررسی	محتوای فنول کل[a]
اقاقیا	برگ	۷۰/۹۹ ± ۰/۰۲
زوفا	اندام هوایی	۴۸/۸۳ ± ۰/۱۰
اُکالیپتوس	برگ	۵۷/۰۰ ± ۰/۰۱

[a] mg gallic acid equivalents/g dry matter

Each value is presented as mean ± SD

تعیین فلاونوئید

میزان فلاونوئید کل موجود در عصاره‌ها طبق روش رنگ‌سنجی ارزیابی شد. معرف رنگی در این روش آلومینیوم کلراید می‌باشد. جهت تعیین مقادیر فلاونوئید کل از استاندارد کوئرستین استفاده گردید و مقادیر فلاونوئید کل به صورت میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه بیان شدند. بر اساس مقادیر جذب مربوط به غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی و مقایسه‌ی آن‌ها با محلول استاندارد کوئرستین، نتایج در جدول ۷ نشان داده شده است. داده‌ها مربوط به سه تکرار می‌باشند. همانطور که در جدول ۷ نشان داده شده است، اندام هوایی زوفا دارای بیشترین محتوای فلاونوئید کل می‌باشد.

جدول ۷- مقادیر فلاونوئید کل گیاهان مورد آزمایش

نام گیاه	اندام مورد بررسی	محتوای فلاونوئید کل[a]
اقاقیا	برگ	۱۰۵/۶۴ ± ۰/۰۲
زوفا	اندام هوایی	۱۱۶/۸۹ ± ۰/۱۰
اُکالیپتوس	برگ	۳۲/۹۶ ± ۰/۰۱

[a] mg quercetin equivalents/g dry matter

Each value is presented as mean ± SD

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره

اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی گونه‌های گیاهی مورد آزمایش در غلظت‌های مختلف تهیه شده از هر عصاره‌ی گیاهی (۰/۵۰، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ ppm) روی سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و راتایی باکتر توکسیکوس) و نیز پنج باکتری گرم منفی (اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس سیرینگه، سودوموناس ویریدی فلاوا و زانتوموناس کمپستریس) پس از چهار تکرار در جداول ۸ تا ۱۳

نشان داده شده است. جداول ۸ و ۹، اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های کلروفرمی و متانولی به دست آمده از برگ‌های گیاه اُکالیپتوس را روی باکتری‌های مختلف استفاده شده در این پژوهش نشان می‌دهد. همانطور که در جدول ۸ مشاهده می‌گردد، عصاره‌ی کلروفرمی برگ‌های گیاه اُکالیپتوس در میان باکتری‌های مورد آزمایش، بیشترین اثر بازدارندگی رشد را در غلظت ۰/۵ ppm و روی دو باکتری باکتر توکسیکوس و زانتوموناس کمپستریس نشان داد. همچنین، عصاره‌ی کلروفرمی اُکالیپتوس در غلظت‌های مختلف مورد آزمایش، هیچ‌گونه اثر مهارکنندگی از رشدی را روی باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس نداشته است. مطابق با جدول ۹، عصاره‌ی متانولی اُکالیپتوس بیشترین اثر بازدارندگی رشد را در غلظت ۰/۵ ppm و روی باکتری زانتوموناس کمپستریس با قطر هاله توقف رشد برابر با ۲/۶ ± ۵۴/۵ نشان داده است. جدول ۱۰ و ۱۱ به ترتیب اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های کلروفرمی و متانولی استخراج شده از اندام‌های هوایی زوفا را روی رشد باکتری‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده، عصاره‌ی کلروفرمی زوفا هیچ گونه فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های مورد آزمایش نداشته است. همانطور که در جدول ۱۱ مشاهده می‌گردد، عصاره‌ی متانولی اندام‌های هوایی زوفا در میان باکتری‌های مورد آزمایش، بیشترین اثر را در غلظت ۰/۵ ppm و روی باکتری اشرشیاکلی نشان داد، به طوریکه قطر هاله توقف رشد در این غلظت برابر با ۵/۲ ± ۴۳ میلی‌متر می‌باشد. جدول ۱۲ و ۱۳ به ترتیب اثر بازدارندگی رشد غلظت‌های مختلف عصاره‌های کلروفرمی و متانولی استخراج شده از برگ‌های گیاه اقاقیا را روی گونه‌های مختلف باکتری مورد بررسی نشان می‌دهد. مطابق با نتایج ارائه شده در جدول ۱۲، عصاره‌ی کلروفرمی برگ‌های گیاه اقاقیا در میان باکتری‌های مورد آزمایش، بیشترین اثر بازدارندگی رشد را در غلظت ۰/۵ ppm و بر روی دو باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس سیرینگه نشان داد، به طوریکه قطر هاله‌ی توقف رشد در این دو گونه و در این غلظت به ترتیب ۰/۸۷ ± ۴۳/۵ و ۲/۰۲ ± ۴۱/۵ میلی‌متر محاسبه شده است. همانطور که در جدول ۱۳ مشاهده می‌گردد، بیشترین اثر بازدارندگی رشد عصاره‌ی متانولی برگ‌های گیاه اقاقیا در میان باکتری‌های مورد آزمایش، در غلظت ۰/۵ ppm و بر روی باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا با قطر هاله‌ی توقف رشد برابر با ۰/۱۴ ± ۱۳/۲۵ میلی‌متر می‌باشد. همچنین نتایج ارائه شده در این جدول نشان می‌دهد که عصاره‌ی متانولی اقاقیا هیچ گونه تأثیر بازدارندگی در رشد روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در هیچ یک از غلظت‌های مورد بررسی نداشته است.

جدول ۸- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی کلروفرمی برگ گیاه اُکالیپتوس

باکتری	قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر					
	غلظت عصاره کلروفرمی اکالیپتوس(ppm)					
	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱
P. aeruginosa	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a
B. subtilis	۱۲/۳۳ ± ۲/۹۱a	۱۱/۶۷ ± ۱/۲۰a	۱۰/۵ ± ۱/۵a	۸/۳۳ ± ۰/۸۸ab	۰ ± ۰c	۰ ± ۰c
E. coli	۱۶/۶۷ ± ۱/۲۰a	۱۴ ± ۰/۵۸a	۱۲/۳۳ ± ۲/۷۳ab	۸/۳۳ ± ۱/۳۳c	۸/۳۳ ± ۱/۳۳c	۰ ± ۰d
S. aureus	۱۷ ± ۱/۱۵a	۱۱/۶۷ ± ۱/۸۶b	۱۱ ± ۰/۵۸b	۱۱ ± ۰/۵۸b	۱۰ ± ۰/۲۹b	۹/۵ ± ۰/۲۹b
R. toxicus	۲۲/۶۷ ± ۱/۴۵a	۲۰/۳۳ ± ۰/۳۳a	۱۹/۳۳ ± ۰/۳۳a	۱۹/۳۳ ± ۰/۸۸a	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b
X. campestris	۲۲/۳۳ ± ۱/۲۰a	۱۷/۶۷ ± ۱/۳۳ab	۱۷ ± ۰/۵۸ab	۱۳/۸۳ ± ۰/۱۷c	۰ ± ۰d	۰ ± ۰d
P. viridiflava	۲۰ ± ۲/۰۸a	۱۳/۶۷ ± ۳/۵۳b	۱۱ ± ۲/۰۸b	۹ ± ۱bc	۰ ± ۰d	۰ ± ۰d
P. syringae	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a

جدول ۹- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی برگ گیاه اُکالیپتوس

باکتری	قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر					
	غلظت عصاره متانولی اکالیپتوس					
	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱
P. aeruginosa	۳۷/۵ ± ۱/۴۴a	۳۲ ± ۱/۱۵ab	۲۹/۵ ± ۰/۲۹b	۲۴/۵ ± ۰/۸۷c	۱۵ ± ۰d	۱۴ ± ۰/۵۸d
B. subtilis	۳۱/۷۵ ± ۴/۴۷a	۲۳/۵ ± ۱/۴۴b	۱۸ ± ۱/۷۳c	۱۶ ± ۰/۵۸c	۱۴/۵ ± ۱/۷۳cd	۱۴/۲۵ ± ۰/۴۳cd
E. coli	۲۹ ± ۰/۵۷a	۲۳ ± ۰/۵۷b	۲۱/۵ ± ۰/۲۹b	۱۹/۵ ± ۰/۲۹b	۱۴/۵ ± ۰/۲۹c	۱۱ ± ۰/۵۸c
S. aureus	۲۸ ± ۰a	۲۴/۵ ± ۰/۲۹ab	۲۰ ± ۰b	۱۷ ± ۰c	۱۴ ± ۰/۵۸cd	۱۱/۵ ± ۰/۲۹d
R. toxicus	۱۹/۷۵ ± ۰/۷۲a	۱۷/۵ ± ۰/۸۷a	۹/۵ ± ۰/۲۹b	۷/۷۵ ± ۰/۱۴b	۷ ± ۰b	۷ ± ۰b
X. campestris	۵۴/۵ ± ۲/۶a	۴۳/۵ ± ۰/۸۷b	۳۹/۵ ± ۳/۱۷bc	۲۴ ± ۰/۵۸d	۲۲/۵ ± ۱/۴۴d	۲۰ ± ۰/۵۸d
P. viridiflava	۲۸/۷۵ ± ۰/۴۳a	۲۷ ± ۴/۰۴a	۲۳/۵ ± ۰/۲۹b	۱۹/۵ ± ۰/۲۹c	۱۳ ± ۰/۵۸d	۹ ± ۰/۵۸d
P. syringae	۲۰ ± ۰a	۱۸/۷۵ ± ۰/۱۴a	۱۸ ± ۰/۵۸a	۱۶/۲۵ ± ۰/۷۲ab	۱۴/۵ ± ۰/۲۹b	۱۲ ± ۰/۵۸b

جدول ۱۰- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی کلروفرمی اندام هوایی گیاه زوفا

باکتری	قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر					
	غلظت عصاره کلروفرمی زوفا					
	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱
P. aeruginosa	۰ ± ۰a	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b
B. subtilis	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a
E. coli	۰ ± ۰a	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b
S. aureus	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a
R. toxicus	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a
X. campestris	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a
P. viridiflava	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a
P. syringae	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a

جدول ۱۱- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی اندام هوایی گیاه زوفا

باکتری	قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر					
	غلظت عصاره متانولی زوفا					
	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱
P. aeruginosa	۲۸ ± ۱/۵۴a	۲۵/۷۵ ± ۰/۴۳a	۲۳ ± ۱/۱۵ab	۲۰/۷۵ ± ۰/۴۳b	۱۳/۷۵ ± ۰/۷۲c	۱۱/۵ ± ۰/۲۹c
B. subtilis	۳۲ ± ۶/۳۵a	۲۷/۲۵ ± ۰/۷۲b	۲۵ ± ۱/۷۳b	۲۲/۵ ± ۲/۰۲c	۲۱/۷۵ ± ۱/۸۸c	۲۱/۲۵ ± ۱/۰۱c
E. coli	۴۳ ± ۵/۲a	۳۱/۵ ± ۰/۲۹b	۲۱ ± ۲/۳۱c	۱۷/۵ ± ۱/۴۴c	۱۳ ± ۰d	۱۲ ± ۰/۵۸d
S. aureus	۲۶ ± ۰/۵۸a	۲۶ ± ۰/۵۸a	۲۱/۵ ± ۲/۳۱b	۱۶/۵ ± ۰/۸۷c	۱۲/۷۵ ± ۰/۱۴d	۱۲/۲۵ ± ۰/۴۳d
R. toxicus	۳۲/۵ ± ۰/۲۹a	۳۲ ± ۰/۵۸a	۳۱ ± ۱/۷۳a	۱۹ ± ۲/۳۱b	۱۱/۷۵ ± ۰/۴۳c	۱۰/۵ ± ۰/۲۹c
X. campestris	۳۷ ± ۲/۳۱a	۲۵ ± ۰/۵۸b	۲۰/۵ ± ۰/۸۷c	۱۷/۵ ± ۰/۲۹c	۱۲/۲۵ ± ۰/۱۴d	۱۱/۷۵ ± ۰/۱۴d
P. viridiflava	۳۷ ± ۱/۱۵a	۲۶/۵ ± ۰/۸۷b	۲۶ ± ۰/۵۸b	۲۶ ± ۰/۵۸b	۲۰/۲۵ ± ۲/۱۶c	۱۸/۲۵ ± ۳/۹c
P. syringae	۲۷/۵ ± ۰/۲۹a	۲۴/۷۵ ± ۰/۴۳a	۱۹ ± ۰/۵۸b	۱۷/۵ ± ۰b	۱۸ ± ۱/۱۵b	۱۶/۵ ± ۱/۴۴b

جدول ۱۲- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی کروفرمی برگ اقاقیا

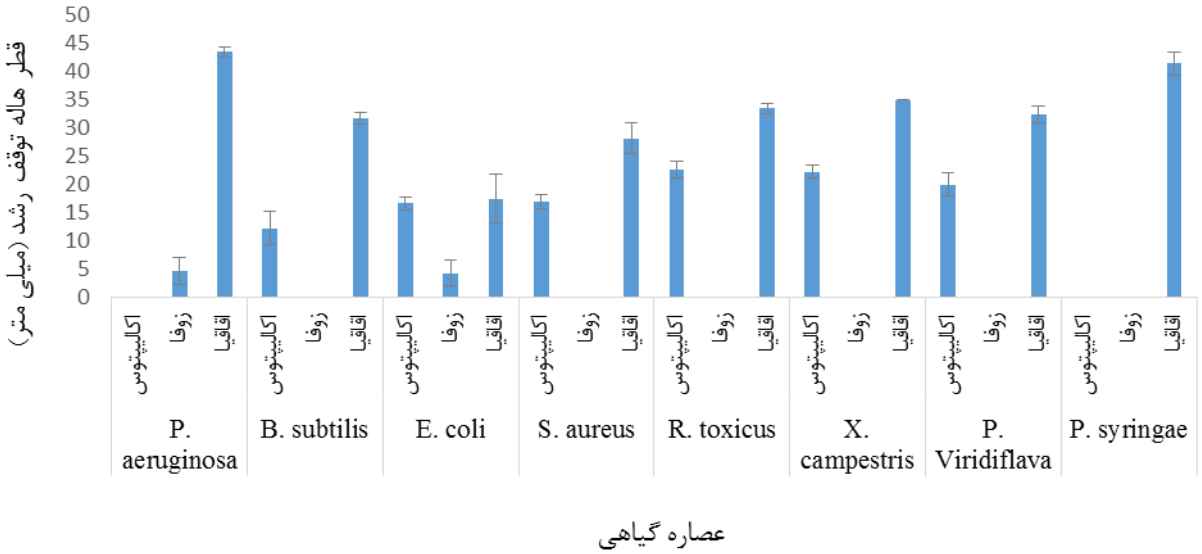
باکتری	قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر					
	غلظت عصاره کلروفرمی اقاقیا					
	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱
P. aeruginosa	۴۳/۵ ± ۰/۸۷a	۳۹ ± ۴/۶۱a	۳۸/۵ ± ۳/۷۵ab	۳۷/۷۵ ± ۰/۴۳^{ab}	۳۶/۷۵ ± ۴/۷۶b	۳۶/۵ ± ۴/۹۱b
B. subtilis	۳۱/۷۵ ± ۱/۰۱a	۲۵ ± ۱/۱۵b	۱۹/۷۵ ± ۰/۷۲b	۱۵/۵ ± ۰/۲۹c	۷ ± ۰d	۷ ± ۰d
E. coli	۱۷/۵ ± ۴/۳۳a	۱۷/۵ ± ۰/۲۹a	۱۶ ± ۰a	۱۶ ± ۲/۸۹a	۱۵/۷۵ ± ۰/۷۲a	۱۴ ± ۰a
S. aureus	۲۸/۲۵ ± ۲/۷۴a	۲۲/۵ ± ۱/۴۴b	۲۰/۷۵ ± ۱/۰۱b	۱۷/۵ ± ۲/۰۲bc	۱۴/۷۵ ± ۰/۱۴c	۱۴/۲۵ ± ۱/۰۱c
R. toxicus	۳۳/۵ ± ۰/۸۷a	۳۱/۵ ± ۳/۷۵a	۳۱ ± ۳/۴۶a	۲۸/۵ ± ۳/۷۵ab	۲۶/۵ ± ۲/۰۲b	۲۵ ± ۰b
X. campestris	۳۵ ± ۰a	۲۶ ± ۰/۵۸b	۲۵ ± ۰/۵۸b	۲۴ ± ۰/۵۸b	۲۳ ± ۰b	۲۱ ± ۰b
P. viridiflava	۳۲/۵ ± ۱/۴۴a	۲۷/۵ ± ۱/۴۴b	۲۴/۷۵ ± ۰/۱۴b	۲۳ ± ۱/۱۵b	۲۱ ± ۱/۱۵bc	۱۸/۵ ± ۲/۰۲c
P. syringae	۴۱/۵ ± ۲/۰۲a	۳۶/۵ ± ۳/۷۵ab	۳۵/۵ ± ۲/۶b	۲۹/۷۵ ± ۱/۰۱c	۲۷/۵ ± ۳/۱۷c	۲۲/۵ ± ۱/۴۴d

جدول ۱۳- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی برگ اقاقیا

باکتری	قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر					
	غلظت عصاره متانولی اقاقیا					
	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱
P. aeruginosa	۱۳/۲۵ ± ۰/۱۴a	۹/۲۵ ± ۰/۱۴ab	۸/۷۵ ± ۰/۱۴b	۸/۵ ± ۰b	۸/۵ ± ۰/۲۹b	۷ ± ۰b
B. subtilis	۹/۲۵ ± ۰/۱۴a	۹ ± ۰/۲۹a	۸ ± ۰a	۷/۵ ± ۰/۲۹a	۷/۲۵ ± ۰/۱۴a	۰ ± ۰b
E. coli	۹/۷۵ ± ۰/۱۴a	۹/۲۵ ± ۰/۷۲a	۸/۲۵ ± ۰/۱۴a	۸ ± ۰/۵۸a	۰ ± ۰b	۰ ± ۰b
S. aureus	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a	۰ ± ۰a
R. toxicus	۹/۲۵ ± ۰/۱۴a	۹ ± ۰/۵۸a	۸/۵ ± ۰/۲۹a	۷/۲۵ ± ۰/۱۴a	۷ ± ۰a	۷ ± ۰a
X. campestris	۹/۲۵ ± ۰/۱۴a	۹/۲۵ ± ۰/۱۴a	۸/۲۵ ± ۰/۱۴a	۸/۲۵ ± ۰/۱۴a	۷/۷۵ ± ۰/۴۳a	۷ ± ۰a
P. viridiflava	۱۰ ± ۰a	۹/۷۵ ± ۰/۱۴a	۹/۲۵ ± ۰/۱۴a	۹ ± ۰a	۷/۷۵ ± ۰/۴۳a	۷/۲۵ ± ۰/۱۴a
P. syringae	۸ ± ۰/۲۹a	۷/۷۵ ± ۰/۱۴a	۷/۵ ± ۰a	۷/۲۵ ± ۰/۱۴a	۷/۲۵ ± ۰/۱۴a	۷ ± ۰a

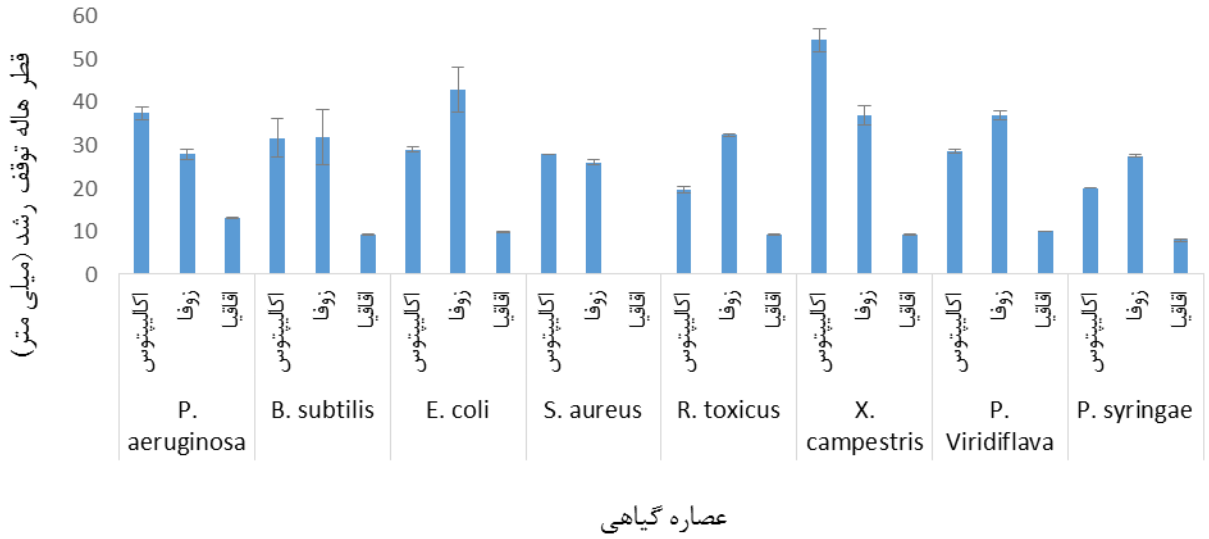
مقایسه‌ی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی کلروفرمی و متانولی گیاهان مورد آزمایش روی باکتری‌های مورد آزمایش

نتایج جداول ۸-۱۳ نشان داد که، بیشترین اثر مهارکنندگی رشد عصاره‌های کلروفرمی و متانولی هر یک از گیاهان مورد آزمایش روی باکتری‌های بیماری‌زای مورد بررسی در این پژوهش مربوط به غلظت ۰/۵ ppm بوده است. بنابراین، در این بخش اثر بازدارندگی رشد هر یک از عصاره‌ها در غلظت ۰/۵ ppm روی گونه‌های مختلف باکتری‌های مورد آزمایش با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج این مقایسه در شکل ۱ و ۲ به تفکیک عصاره‌ی گیاهی آورده شده است. مطابق با نتایج ارائه شده در شکل ۱، بیشترین اثر ضد باکتریایی در بین عصاره‌های کلروفرمی سه گونه‌ی گیاهی روی گونه‌های مختلف باکتری، مربوط به عصاره‌ی کلروفرمی اقاقیا است. در حالی‌که با توجه به شکل ۲، مشخص گردید که عصاره‌ی متانولی اقاقیا اثر بازدارندگی کمتری روی باکتری‌های مورد آزمون نسبت به دو عصاره‌ی متانولی اُکالیپتوس و زوفا دارد.



شکل ۱- مقایسه فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی کلروفرمی اُکالیپتوس، زوفا و اقاقیا در غلـظت ۰/۵ ppm

جاهای خالی نشان‌دهنده‌ی این است که عصاره‌ی گیاهی مورد نظر فعالیت ضد باکتریایی روی باکتری مورد آزمون نداشته است.



شکل ۲- مقایسه فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی کلروفرمی اُکالیپتوس، زوفا و اقاقیا در غلـظت ۰/۵ ppm

بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره‌های کلروفرمی و متانولی گیاهان اُکالیپتوس، زوفا و اقاقیا

بررسی های انجام شده نشان داد که، عصاره های کلروفرمی و متانولی گیاهان مورد بررسی هیچ گونه اثرات ضد قارچی روی قارچ‌های؛ *Pyricularia oryzae*، *Botrytis cinerea* و *Fusarium oxysporum* نداشته است.

بحث

روش‌های معمول کنترل آفات گیاهی (حشرات و عوامل بیماری‌زای گیاهی) عمدتاً شامل استفاده از ترکیبات شیمیایی سنتزی است. استفاده‌ی بی‌رویه از این ترکیبات و نیز عدم رعایت دُز و زمان مصرف منجر به بروز پدیده‌ی مقاومت در بین آفات گیاهی شده است. امروزه ثابت شده است که بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا در برابر ترکیبات آفت‌کش سنتزی مقاومت پیدا کرده‌اند (Kotan et al., 2007). بروز مقاومت در بین عوامل بیماری‌زای گیاهی با توجه به شرایط تکثیر این میکروأرگانیسم‌ها بیش از آفات حشره‌ای در حال توسعه است به طوریکه امروزه گزارش‌های متعددی از عدم تأثیر مطلوب آفت‌کش‌های سنتزی در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی وجود دارد. بروز مقاومت از یک طرف و اثرات سو زیست محیطی آفت‌کش های شیمیایی از طرف دیگر امروزه منجر شده است که پژوهشگران عرصه‌ی کنترل آفات گیاهی به دنبال یافتن روش‌های ایمن و در عین حال کارا در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی باشند. گیاهان موجوداتی هستند که در طی میلیون‌ها سال زیست روی کره‌ی زمین از دیرباز با عوامل بیماری‌زای گیاهی در تنازع بوده‌اند و در طی تکامل، گیاهان به روش‌های مختلف درصدد فایق آمدن بر عوامل بیماری‌زای گیاهی بوده‌اند. در مقابل این، عوامل بیماری‌زای گیاهی نیز تکامل یافته‌اند تا بتوانند از گیاهان میزبان خود استفاده کنند. گیاهان موادی به نام متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که این متابولیت‌ها

نقشی در تکمیل چرخه‌های زیستی حیاتی گیاهان ندارند، بلکه به عنوان ابزار دفاعی گیاهان در برابر آفات و بیماری‌های گیاهی حائز اهمیت هستند. لذا به نظر می‌رسد که گیاهان با توجه به پراکنش گسترده‌ای که دارند و از طرف دیگر مواد ثانویه ای که تولید می‌کنند بتوانند منبع خوبی برای تأمین موادی با خاصیت ضد میکروبی جدید باشند (Raghavendra et al., 2008). در مطالعه‌ی حاضر اثر ضد باکتریایی چندین عصاره‌ی گیاهی علیه طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زای گیاهی مورد آزمون قرار گرفت. قطر هاله‌ی توقف رشد باکتری‌های مختلف تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی مورد بررسی اندازه‌گیری شد و نتایج در جداول ۸-۱۳ نشان داده شده است. در این مطالعه، شش غلظت مختلف از هر یک از عصاره‌های متانولی و کلروفرمی گیاهان دارویی مورد بررسی، مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه‌ی آماری مربوط به غلظت‌های هر یک از عصاره‌های گیاهی به تفکیک در جداول ۸-۱۳ نشان داده شده است. به منظور مقایسه‌ی عصاره‌های گیاهی مختلف با یکدیگر، غلظت ۰/۵ پی پی ام هر یک از عصاره‌های گیاهی که به طور معمول و طبق جداول ۸-۱۳ بیشترین قطر هاله‌ی توقف رشد باکتری را در مطالعه‌ی حاضر داشته است، به عنوان غلظت مورد مقایسه انتخاب شدند. مقایسه‌ی عصاره‌های مختلف در غلظت یاد شده نشان داد که بیشترین قطر هاله‌ی توقف رشد به استثنای باکتری‌های *P. aeruginosa*، *S. aureus* و *X. campestris* مربوط به عصاره‌ی متانولی استخراج شده از زوفا بوده است. این موضوع نشان از قدرت بالای ضد باکتریایی این عصاره روی باکتری‌های مورد آزمون داشته است. کمترین اثر ضد باکتریایی در بین عصاره‌های متانولی مورد آزمون، مربوط به اقاقیا است. از بین عصاره‌های کلروفرمی مورد مطالعه بیشترین اثر ضد باکتریایی مربوط به اقاقیا و کمترین مقدار مربوط به زوفا بوده است. تنوع فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مورد بررسی را می‌توان به دلیل تفاوت ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان مورد استفاده در تولید عصاره مرتبط دانست (Bhardwaj and Laura, 2009). در این بین نقش حلال مورد استفاده در استخراج عصاره نیز در اثرات ضد میکروبی بسیار حائز اهمیت است به طوریکه حلالیت حلال مورد استفاده در استخراج ترکیبات طبیعی عصاره بسیار مؤثر است. مطالعات متعددی روی اثر ضد میکروبی عصاره‌ی استخراج شده از گیاهان روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی انجام شده است. گزارش شده است که عصاره‌ی آبی استخراج شده از برگ‌های گیاه سیر اثر مهار کنندگی رشد روی باکتری‌های جنس *Pseudomonas* و *Xanthomonas* داشته است (Jeyaseelan et al., 2010). همانطور که در جداول ۸-۱۳ مشاهده می‌گردد، در اکثر تیمارها با افزایش غلظت عصاره‌ی گیاهی اثر ضد باکتریایی آن‌ها افزایش یافته است و در واقع حالت اثر ضد میکروبی مشاهده شده وابسته به غلظت است. این موضوع در مطالعات سایر محققان از جمله؛ باگوات و داتار (۲۰۱۴)، جیلاسیلان و همکاران (۲۰۱۰) و باردواج و لورا (۲۰۰۹) گزارش شده است.

نتایج کاربردی و رضایت‌بخش استفاده از متابولیت‌های گیاهی در زمینه‌های مختلف از جمله؛ پزشکی و بهداشت، کشاورزی و دامپزشکی امروزه منجر به معرفی و ورود ترکیبات آفت‌کش با منشاء گیاهی در کنترل بیماری‌های زراعی به بازار شده است. امروزه اجزای سازنده‌ی بسیاری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی شناسایی شده است و محققان اثر ضد میکروبی هر یک از اجزای موجود در ترکیبات سازنده‌ی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی را مورد پژوهش قرار داده‌اند. این پژوهش‌ها نشان داده است که، اجزای اسانس‌ها و

عصاره‌ها اثرات ضد میکروبی متفاوتی دارند. مکانیزم عمل دقیق فعالیت ضد میکروبی اجزای موجود در اسانس و عصاره‌های گیاهی به درستی درک نشده است. ولی شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد مکانیزم اصلی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می‌شود. بررسی‌های صورت گرفته نشان داده است که ترکیبات مشتق شده از گیاهان نفوذ پذیری غشای سلولی میکروارگانیسم‌های تحت بررسی را افزایش می‌دهند و از این طریق تعادل یون‌های مختلف در دو سوی غشاء را بر هم می‌زنند. گروه هیدروکسیلی موجود در مولکول اجزای ترکیبات گیاهی مانند؛ کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول خاصیت ضد باکتریایی بالایی دارند (Sandri et al., 2007).

عبدالملکی و همکاران (۱۳۹۰)، فعالیت ضد قارچی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی اکالیپتوس را علیه قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه مورد بررسی قرار دادند. این محققان نقش حلال مورد استفاده در تهیه‌ی عصاره را در فعالیت قارچی اکالیپتوس مهم توصیف کرده‌اند و عنوان نمودند که از بین سه حلال مورد استفاده، عصاره‌ی متانولی دارای بیشترین فعالیت ضد قارچی است. بر خلاف یافته‌های این محققان در تحقیق حاضر هیچ یک از عصاره‌های تهیه شده با دو حلال متانول و کلروفرم اثر ضد قارچی نشان ندادند. علت این تضاد مشاهده شده می‌تواند تفاوت قارچ‌های بیمارگر مورد استفاده در تحقیق عبدالملکی و همکاران (۱۳۸۸) و مطاالعه‌ی حاضر دانست. آل عابد و همکاران (۱۹۹۳)، نیز در مشاهدات خود، وجود مواد مؤثره‌ی ضد میکروبی در عصاره‌ی گیاهان را متأثر از چندین فاکتور از جمله؛ روش استخراج، سن گیاه، زمان برداشت مواد گیاهی و حلال‌های استخراج کننده، اعلام نمودند. در بین ترکیبات موجود در اکالیپتوس، ماده ۱ و ۸-سینئول ماده‌ی اصلی تشکیل دهنده‌ی اسانس اُکالیپتوس است (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007; Zargari, 1996). این ماده می‌تواند به تنهایی و یا در تعامل با سایر ترکیبات موجود به عنوان ماده‌ی مؤثر در بازدارندگی عصاره این گیاه منظور شود.

اجزای شناسایی شده در اسانس گیاه اقاقیا در کشورهای مختلف بررسی شده است (خوش خلق و همکاران ۱۳۹۰; Kamdem et al., 1994; Joulian, 1986;). با توجه به این گزارشات می‌توان این‌گونه بیان کرد که، نوع و درصد ترکیب‌های معطر و همچنین فلاونوئیدهای موجود در گل و برگ اقاقیا در کشورها و شرایط آب و هوایی مختلف به شدت متفاوت است. در مطالعه‌ی حاضر بررسی کمی و کیفی اسانس اقاقیا نشان داد که، جزء اصلی موجود در اسانس این گیاه، فیتول[1] است که در حدود ۶۵ درصد اجزای شناسایی شده در اسانس اقاقیا را تشکیل می‌دهد. این ترکیب یک الکل دی ترپن فاقد حلقه است این ترکیب به طور گسترده در کلروفیل گیاهان به کار رفته است. خاصیت ضد باکتریایی این ترکیب روی باکتری *P. aeruginosa* گزارش شده است (Lee et al., 2016). در باکتری‌های تیمار شده با فیتول میزان اکسیژن فعال بین سلولی و از بین رفتن NADH افزایش یافت. این موضوع نشان می‌دهد که فیتول منجر به القای تولید گونه‌های اکسیژن فعال و تجمع آن‌ها در سلول شده و باعث اختلال در عملکرد عادی زنجیره‌ی انتقال الکترون از طریق افزایش سطح اکسیژن فعال می‌گردد. به علاوه فیتول منجر به آسیب شدید DNA باکتریایی می‌شود (Lee et al., 2016). اثر ضد باکتریایی فیتول روی باکتری *Staphylococcus aureus* گزارش شده است (Togashi et al., 2010).

[1] Phytol

حسن شاهیان و همکاران (۲۰۱۹)، نشان دادند پنج ترکیب فعال و مؤثره در عصاره‌ی گیاه زوفا وجود دارد که جزء اصلی، 2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxylmethyl) است. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که، جزء اصلی تشکیل دهنده‌ی اسانس زوفا اسپاتولنول می‌باشد. علت تفاوت مشاهده شده در تحقیق حاضر با مطالعه‌ی حسن شاهیان و همکاران (۲۰۱۹)، به ماهیت ترکیب استخراجی برمی‌گردد، چرا که در مطالعه‌ی حسن شاهیان و همکاران ترکیبات سازنده‌ی عصاره مورد بررسی قرار گرفته است در حالیکه در تحقیق حاضر اجزای موجود در اسانس مورد شناسایی قرار گرفته است و همانطور که در بالا ذکر شد روش استخراج و نوع ترکیب در شناسایی اجزای سازنده بسیار حائز اهمیت است.

به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که عصاره‌های مورد استفاده در این تحقیق پتانسیل بالایی در کنترل باکتریی‌های بیماری‌زای گیاهی دارند. با توجه به اینکه در دهه‌ی اخیر استفاده از ترکیبات گیاهي در قالب مبارزه با بیماري‌هاي انساني به شدت رو به فزوني يافته و بشر استفاده از ترکیبات گیاهي را در بسياري از مواقع به ترکیبات شیمیايي ترجیح مي‌دهد، استفاده از ترکیبات مختلف گیاهي علیه بیماري‌هاي گیاهي که به نوعي با سلامتي انسان نیز در ارتباط مي‌باشد، امري ضروري به نظر مي‌رسد. در این میان مي‌توان با آزمایش‌هاي تکمیلي به ترکیبات گیاهي مؤثرتري دسترسي پیدا کرد و با استفاده از این ترکیبات در کنار سایر روش‌هاي بیوکنترلي و استفاده از ارقام مقاوم در قالب يك مدیریت تلفیقي براي کنترل این بیماري‌ها اقدام نمود. امید است که نتایج این تحقیق بتواند در کنار نتایج سایر آزمایش‌ها در رسیدن به اهداف مدیریت بیماري در کشاورزي پاك مثمر ثمر باشد.

سپاسگزاری

از مجموعه‌ی مدیریت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و همکاران آن حوزه که امکانات مورد نیاز را در اختیار ما قرار دادند، صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع

خوش خلق پهلوياني، م.، مسيحا، ع.، عيسي زاده، خ.، بيدريغ، س. و گياهي، م. (۱۳۹۰). ارزيابي فعاليت ضد قارچي عصاره متانولي برگ‌هاي گياه اقاقيا (*Anagalis arvensis*) و نيستاتين در مقابل ايزوله‌هاي کلينيکي و سويه استاندارد کانديدا آلبيکانس در شرايط آزمايشگاهي. مجله تحقيقات علوم پزشکی زاهدان، ۲۵-۲۹.

عبدالملکي، م.، بهرام نژاد، ص. و عباسي، س. (۱۳۹۰). بررسي اثرات ضد قارچي عصاره‌هاي برخي گياهان عليه چهار قارچ بيماري‌زاي گياهي. مجله گياهان دارويی، ۱۰(۳۸)، ۱۴۸-۱۵۵.

علی‌نژاد، ح.، قهاری، س.، نعمت‌زاده، ق.ع، تاجبخش، م. و بهارفر، ر. (۱۳۹۵). بررسی ترکیب‌های شیمیایی و اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی متانولی دانه‌ی سویا. زیست فناوری گیاهان داروئی، ۲، ۳۷-۴۷.

محمودي، ه.، رهنما، ک. و عرب‌خاني، م.ع. (۱۳۸۹). بررسي اثر ضد باکتريايي اسانس و عصاره آبي گياهان دارويي بر باکتري‌هاي عامل شانکر و لکه برگي درختان ميوه هسته دار. گیاهان دارویی، ۹ (۳۶) ۳۴-۴۲.

Al-Abed, A., Qasem, J. and Abu-Blan, H.A. (1993). Antifungal effects of some common wild plant species on certain plant pathogenic fungi. Dirasat Series B, Pure and Applied Sciences, 20(3), 149-58.

Alam, A., Sharma, V. and Sharma, S.C. (2012). In Vitro Antifungal Efficacies of Aqueous Extract of *Targionia Hypophylla* L. against growth of some pathogenic fungi. International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine, 2(02).

Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102(4), 1233-1240.

Arora, A., Sairam, R. and Srivastava, G. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science-Bangalre, 82(10), 1227-1238.

Bhagwat, M.K. and Datar, A.G. (2014). Antibacterial activity of herbal extracts against five plant pathogenic bacteria. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(7), 892-899.

Bhardwaj, S.K. and Laura, J.S. (2009). Antibacterial activity of some plant extracts against plant pathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Indian Journal of Agriculture Research, 3(1), 26-31.

Brader, L. (1979). Integrated pest control in the developing world. Annual Review of Entomology, 24(1), 225-254.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

Chance, B. and Maehly, A. (1955). Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology, 2, 764-775.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3).

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 564-582.

Farahani, S., Bandani, A. and Eslami, S. (2018). Comparison of susceptibility of two Iranian populations of *Tetranychus urticae Koch* (Acari: Tetranychidae) to spirodiclofen. Persian Journal of Acarology, **7**(3).

Ghahari, S., Alinezhad, H., G.A., Nematzadeh, Tajbakhsh, M. and Baharfar, R. (2017). Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil and Extract of the Seeds of *Glycine max* (Soybean) from North Iran. Current Microbiology, 74(4), 522-531.

bacteria. Archives of Applied Science Research, 2(6), 325-331.

Joulian, D. (1986). Progress in essential oil research (Proc. Intern. Symp. Ess. Oils) Berlin, 57-67.

Kamdem, D.P., Gruber, K., Barkman, T. and Gage, D.A. (1994). Characterization of black locust floral fragrance. Journal of Essential Oil Research, 6(2), 199-200.

Kang, H.M. and Saltveit, M.E. (2001). Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. Physiologia Plantarum, 113(4), 548-556.

Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant physiology, 57(2), 315-319.

Kotan, R., Dadasoglu, F., Kordali, S., Cakır, A., Dikbas, N. and Cakmakcı, R. (2007). Antibacterial activity of essential oils extracted from some medicinal plants, carvacrol and thymol on *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria (Doidge) Dye causes bacterial spot disease on pepper and tomato. Journal of Agricultural Technology, 3(2), 299-306.

Lee, W., Woo, E-R. and Lee, D.G. (2016). Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. Free radical research. 50(12), 1309-1318.

Liu, X. and Huang, B. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. Crop Science, 40(2), 503-510.

Liyana-Pathirana, C.M. and Shahidi, F. (2005). Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. Journal of agricultural and food chemistry, 53(7), 2433-2440.

Raghavendra, M., Satish, S. and Raveesha, K. (2008). In vitro antibacterial potential of alkaloids of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. against Xanthomonas and human pathogenic bacteria. World Journal of Agricultural Sciences, 4(1), 100-105.

Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G.A. and Ghahari, S. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activities of the constituents isolated from *Koelreuteria paniculata* leaves. Natural product research, 29(19), 1865-1869.

Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G.A., Tajbakhsh, M. and Baharfar, R. (2017). Biochemical Composition, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil and Fruit Extract of *Xanthium strumarium* Linn. From Northern Iran. Journal of Agricultural Science and Technology, 19, 1603-1616.

Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G.A., Tajbakhsh, M. and Baharfar, R. (2018). Phytochemical, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil of *Astragalus alopecurus* Pall. Fruits from Northern Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 21(1), 103-115.

Gurjar, M.S., Ali, S., Akhtar, M. and Singh, K.S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. Agricultural Sciences, 3(3), 425.

Hassanshahian, M., Saadatfar, A. and Masoumi, F. (2019). Antimicrobial Properties of *Hyssopus Officinalis* Extract Against Antibiotic-Resistant Bacteria in Planktonic and Biofilm Form. Biological Journal of Microorganism, **7**(28).

Isman, M.B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology, 51, 45-66.

Isman, M.B. (2016). Pesticides based on plant essential oils: phytochemical and practical considerations. Medicinal and aromatic crops, Production. Phytochemistry and Utilization, 13-26.

Isman, M.B. and Machial, C.M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Advances in phytomedicine, 3, 29-44.

Jeyaseelan, E., Pathmanathan, M. and Jeyadevan, J. (2010). Inhibitory effect of different solvent extracts of *Vitex negundo* L. and *Allium sativum* L. on phytopathogenic

& medicinal chemistry letters, 11(19), 2603-2606.

Togashi, N., Hamashima, H., Shiraishi, A., Inoue, Y. and Takano, A. (2010). Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* of terpene alcohols with aliphatic carbon chains. Journal of Essential Oil Research, 22(3), 263-269.

Veitch, N.C., Elliott, P.C., Kite, G.C. and *Lewis*, G.P. (2010). Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). Phytochemistry, 71(4), 479-486.

Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(6), 1619-1624.

Zargari, A. (1996). Medicinal Plants. 6th ed, University Press, Tehran.

Sandri, I., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A. and Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Cunila against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry, 103(3), 823-828.

Shariff, N., Sudarshana, M.S., Umesha, S. and Hariprasad, P. (2006). Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. African Journal of Biotechnology, **5**(10).

Sultana, B., Anwar, F. and Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. Food Chemistry, 104(3), 1106-1114.

Tian, F., Chang, C.J., Grutzner, J.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L. (2001). Robinlin: A novel bioactive homo-monoterpene from *Robinia pseudoacacia* L.(Fabaceae). Bioorganic

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 4, No 2, Autumn & Winter 2019

Investigating of chemical compounds of essential oils and antibacterial, antifungal and antioxidant effects of methanolic and chloroform extracts of Eucalyptus, Hyssop and False Acacia

Zahra Hadadi[1], Ghorban Ali Nematzadeh[2]*, Somayeh Ghahari Kouchaksaraei[3]

Abstract

The medicinal plants are widely considered to be an alternative agent for chemical pesticides. In this study, antibacterial, antifungal and antioxidant activity of several medicinal plants such as *Robinia pseudoacacia*, *Eucalyptus tereticornis*, and *Hyssopus officinalis* and their chemical compounds were evaluated against several bacterial and fungal pathogens that attack to agricultural product including three positive bacteria, five Gram-negative bacteria and three fungies using the disc diffusion method. Also, the antioxidant activity of these plants was measured by enzyme activities of catalase, guaiacol peroxidase, and DPPH. In addition, the amount of phenol and flavonoid of these plants were measured. Based on the obtained results, the highest and lowest antibacterial activity was recorded for the methanolic extract from *R. pseudoacacia* and *H. officinalis*, respectively. Among chlorophormic extracts, *H. officinalis* and *R. pseudoacacia* showed the highest and lowest antibacterial activity. None of the three extracts had no antifungal activity. The components of the essential oils of these three herbs were identified, so that the main composition of the essential oils of Eucalyptus, Acacia and Zoospha were Sputulenol, Phytol and Sputulenol, respectively. According to the results obtained from this study, it can be concluded that the extracts of these three plants can be considered as a suitable candidate for further investigation in semi-field and field conditions to verify their ability in the natural condition.

Keywords: Essential oils, plant extract, antibacterial activity, antifungal effect, antioxidant activity

[1] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Taberestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

[2]* Corresponding author , Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Taberestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. Email: gh.nematzadeh@gmail.com

[3] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Taberestan (GABIT), Sari, Iran