دانش بیماری‌شناسی گیاهی
سال ۱۳، جلد ۱، پاییز و زمستان ۱۴۰۲
Plant Pathology Science
Vol. 13(1), 2024
(eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Website: http://yujs.yu.ac.ir/pps/

Research Article

The impact of Osage orange fruit and leaf aqueous and ethanolic extracts on *Erwinia amylovora*, the cause of apple and pear fireblight

Toktam Selahvarzi[1], Bahram Abedy[1]✉, Nasser Beikzadeh[2]*

1. Department of Horticultural Science and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.

Received: 2024.03.18 Revised: 2024.06.10 Accepted: 2024.07.25

Selahvarzi, T., Abedy, B., & Beikzadeh, N. (2024). The impact of Osage orange fruit and leaf aqueous and ethanolic extracts on *Erwinia amylovora*, the cause of apple and pear fireblight. *Plant Pathology Science, 13(1),* 75-88.

Abstract

Fire blight caused by *Erwinia amylovora* is one of the most important diseases of apple and pear trees in the world. The purpose of this research was to determine the antibacterial effect of the ethanolic and aqueous extracts of the fruit and leaf of the Osage orange (*Maclura pomifera*) against the cause of this disease. The effect of ethanolic and aqueous extracts of leaf and fruit of this plant on the growth of *E. amylovora* colony in eight concentrations was tested by disk diffusion method. Antioxidant activity and total phenol of these extracts were also measured. The experiment was conducted as a factorial in a completely randomized design with four replications for each treatment in laboratory conditions. The results showed that the type of extract and plant organ are effective in the antibacterial properties, antioxidant activity, and the amount of total phenol. The ethanolic extract of the fruit, at a concentration of 1000 mg/ml with an average diameter 5.57 mm inhibitory halo had the highest inhibitory effect against *E. amylovora*, antioxidant activity, and total phenol content, while the aqueous extract of the fruit and the aqueous and ethanolic extracts of the leaf weren't significantly effective. Therefore, the ethanolic extract of Osage orange fruit has an inhibitory effect on the growth of *E. amylovora* colony and can be considered as a natural compound in the management of the disease.

Keywords: Antibacterial property, Antioxidant activity, Total phenol

✉Corresponding author: abedy@um.ac.ir

*Credit authors statement: Toktam Selahvarzi: M.Sc. student, Investigation; Bahram Abedy: Supervisor; Nasser Beikzadeh: Advisor

مقاله پژوهشی

اثر عصاره‌های آبی و اتانولی میوه و برگ توت آمریکایی بر *Erwinia amylovora* عامل آتشک سیب و گلابی

تکتم سلاحورزی[1] ، بهرام عابدی[1]✉، ناصر بیک‌زاده[2*]

۱. گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

دریافت: ۲۸/ ۱۲/ ۱۴۰۲ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱ پذیرش: ۰۴/ ۰۵/ ۱۴۰۳

سلاحورزی، ت.، عابدی، ب.، و بیک‌زاده، ن. (۱۴۰۲). اثر عصاره‌های آبی و اتانولی میوه و برگ توت آمریکایی بر *Erwinia amylovora* عامل آتشک سیب و گلابی. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی، ۱۳ (۱)*، ۸۸-۷۵.

چکیده

آتشک ناشی از *Erwinia amylovora* یکی از بیماری‌های مهم درختان سیب و گلابی در جهان است. هدف از این پژوهش، تعیین اثر ضدباکتریایی عصاره‌های اتانولی و آبی میوه و برگ درخت توت آمریکایی یا پرتقال اوسیج (*Maclura pomifera*) علیه عامل این بیماری بود. اثر عصارههای اتانولی و آبی برگ و میوه این گیاه بررشد کلنی *E. amylovora* در هشت غلظت با روش انتشار در دیسک آزمایش شد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل این عصارهها نیز اندازه‌گیری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. یافته‌ها نشان دادند که نوع عصاره و اندام گیاهی در خاصیت ضد باکتریایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل کل موثر است. عصاره اتانولی میوه با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با قطر متوسط هاله بازدارندگی ۵/۵۷ میلی‌متر، بیشترین اثر بازدارندگی را در برابر *E. amylovora*، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنل کل داشت، در حالی که عصاره آبی میوه و عصاره آبی و اتانولی برگ تاثیر معنی‌داری نداشتند. بنابراین عصاره اتانولی میوه توت آمریکایی تاثیر بازدارندگی از رشد کلنی *E. amylovora* دارد و می‌تواند در مدیریت بیماری به عنوان یک ترکیب طبیعی در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: خاصیت ضد باکتریایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل

مقدمه Introduction

بیماری آتشک ناشی از باکتری *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920، درختان میوه دانه‌دار مانند سیب و گلابی را مورد هجوم قرار داده و خسارت زیادی به محصول آنها در بیشتر مناطق جهان وارد می‌کند(Vanneste 2000). این باکتری گرم منفی بوده و دمای بهینه

* نقش نویسندگان در پژوهش: تکتم سلاحورزی: دانشجوی کارشناسی‌ارشد، پژوهشگر، بهرام عابدی: استاد راهنما، ناصر بیک‌زاده: استاد مشاور

فعالیت آن بین ۲۳ تا ۳۰ درجه سلسیوس می‌باشد (Gusberti et al. 2015). ترکیبهای مسی و آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله سمهایی هستند که برای مدیریت بیماری در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند با این حال به‌دلیل خطر بروز مقاومت در جمعیت باکتری، استفاده از این سمها در برخی کشورها ممنوع یا محدود شده است (Iacobellis et al. 2005). عصاره‌های گیاهی به دلیل داشتن ترکیبهای موثر بیوشیمیایی مختلف و منحصربه‌فرد، برای مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند (Hermann et al. 2022, Tsao et al. 2003). امروزه با توجه به مشخص شدن بیش از پیش زیان‌های سمهای شیمیایی برای انسان و محیط زیست، موضوع جایگزینی سمهای شیمیایی با ترکیبهای گیاهی و طبیعی برای مدیریت این بیماری نیز مورد توجه محققین قرار گرفته است (Baysal et al. 2002, Zeller & Laux 2006, Arafat et al. 2015, Saneinasab et al. 2015, Akhlaghi et al. 2020, Hafez et al. 2021, Deresa & Diriba 2023).

درخت توت آمریکایی یا پرتقال اوسیج (Osage orange، *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid.)، درختی مقاوم از تیره *Moraceae* و بومی آمریکای شمالی است (Coder 2024). علی‌رغم غیرخوراکی بودن میوه این درخت، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و مشتقات فلاونوییدی عصاره میوه آن به اثبات رسیده است (Partridge 2011, Sainz-Hernández et al. 2023). همچنین در پژوهشهای متعددی مشخص شده است که عصاره‌های برگ و میوه این درخت، خاصیت ضدباکتریایی قوی دارند (Gusberti et al. 2015, Canli et al. 2017). پژوهشی نشان داده است که عصاره اتانولی میوه درخت توت آمریکایی دارای فعالیت ضدمیکروبی بوده و یک منبع آنتی‌اکسیدان قوی است (Dadayan et al. 2021). اثر ضدباکتریایی اسانس میوه توت آمریکایی روی پنج باکتری *Bacillus subtilis*، *Staphylosccus aureus*، *Enterobacter faecalis*، *Echerchia coli* و *Salmonella typhimurium*، به اثبات رسیده است (Fatnassi et al. 2011). در مطالعه‌ای مشخص شدکه مخمرها، قارچها و باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش در برابر عصاره اتانولی برگ این درخت مقاوم هستند ولی باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش، به عصاره اتانولی بسیار حساس بودند (Filip et al. 2019). در مطالعه‌ای دیگر در زمینه فعالیت ضدمیکروبی عصاره درخت توت آمریکایی روی باکتری *Pseudomona syringae* مشخص شد که برای مبارزه زیستی بیماری‌های باکتریایی گیاهی، عصاره این درخت گزینه‌ای مناسب، کارآمد و اقتصادی می‌باشد (Ríos-Herrera et al. 2021).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی و آبی برگ و میوه این درخت بر رشد کلنی *E. amylovora*، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل موجود در موثرترین عصاره برای یافتن راه‌کاری غیرشیمیایی برای مدیریت بیماری آتشک دانه‌داران بود.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

آزمایش اثر بازدارندگی از رشد کلنی *E. amylovora* عصارههای آبی و اتانولی میوه و برگ توت آمریکایی

جدایه باکتری *E. amylovora* از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی در دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید و در محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد. جدایه فوق از نظر مشخصات کلنی باکتری بر روی محیط کشت آگار مغذی حاوی نیم درصد ساکاروز، قدرت بیماری‌زایی روی میوه نارس گلابی و خواص بیوشیمیایی آن شامل استفاده از سیترات و قندهای سوربیتول و رافینوز بررسی شد (Sulsow et al. 1982, Kim et al. 1999, MacFaddin 2000, Paulin 2000, Jones and Geider 2001, Kim et al. 2001, Schaad et al. 2001, Rosello et al. 2002, Harley 2013). به منظور تهیه کشت خالص، از محیط کشت آگار مغذی حاوی نیم درصد ساکاروز استفاده گردید و کلنی‌های خالص، در داخل آب مقطر سترون و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور تکثیر باکتری و تهیه سوسپانسیون باکتری جهت بررسی تاثیر عصاره‌ها، از محیط کشت آبگوشت مغذی (Nutrient broth) استفاده شد (Mortazavi et al. 2014).

برگ و میوه درخت توت آمریکایی که در شهریور ماه از مرکز پژوهشهای و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی (مشهد) جمع‌آوری شده بودند، با هیپوکلریت‌سدیم سه درصد ضدعفونی سطحی شده و سپس قطعات دو تا سه سانتی‌متری از میوه‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در داخل آون به مدت پنج تا هفت روز خشک شدند. برگ‌ها و میوه‌های خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب، پودر و تا زمان استفاده، در یخچال نگهداری شدند (Ríos-Herrera et al. 2021). اتانول و آب برای استخراج ترکیبهای فعال، به عنوان حلال پودرهای میوه و برگ (هریک به میزان ۵۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال) استفاده شدند. پودر میوه به مدت سه روز در دمای اتاق و برگ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در داخل اتانول ۷۰ درصد در ۱۴۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. سپس عصاره به‌دست‌آمده، از کاغذ صافی (واتمن شماره ۴۱) و قیف بوخنر عبور داده شده و جهت تکمیل عصاره‌گیری، مواد باقیمانده روی کاغذ صافی، با کمی اتانول شسته شدند. به منظور تبخیر حلال و تغلیظ عصاره فیلتر شده، عصاره در داخل دستگاه تقطیر در خلاء و دمای ۵۰ درجه سلسیوس گذاشته شد. پس از تبخیر باقیمانده حلال در آون و خشک شدن کامل عصاره، پودر به‌دست آمده تا زمان آزمایش، در ظرفهای سترون غیرقابل‌نفوذ و دمای چهار درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شد (Filip et al. 2021, Ríos-Herrera et al. 2021).

برای سنجش اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و میوه، از روش انتشار در دیسک استفاده شد. با استفاده از یک پی‌پت پاستور ال‌مانند، مقدار ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 CFU/ml روی سطح محیط آگار مغذی در داخل تشتک‌های پتری به صورت یکنواخت پخش شد و پس از ۱۵ دقیقه، سطح محیط کشت خشک گردید (Akhlaghi et al. 2020). سپس مقدار ۲۵

میکرولیتر از غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی و آبی، به آرامی روی دیسک‌های کاغذی به قطر شش میلی‌متر انتقال داده شد. پس از ۱۵ دقیقه که سطح دیسک‌ها خشک گردید، با استفاده از یک پنس سترون، در مرکز هر تشتک پتری، یک دیسک گذاشته شد و سپس تشتک‌های پتری در داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند (Akhlaghi et al. 2020). برای هر تیمار که شامل هشت غلظت از عصاره‌های اتانولی و آبی میوه و برگ بودند، چهار تکرار در نظر گرفته شدند. کشت‌ها از نظر تشکیل و یا عدم تشکیل هاله بازداری رشد کلنی باکتری در اطراف دیسک، بررسی شده و هر ۲۴ ساعت یک بار به مدت یک هفته قطر هاله بازداری در اطراف دیسک بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. دیسک حاوی ۲۵ میکرولیتر استرپتومایسین یک درصد به عنوان شاهد مثبت و دیسک حاوی ۲۵ میکرولیتر حلال (اتانول ۷۰ درصد) به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند (Ríos-Herrera et al. 2021, Canli et al. 2017).

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration= MIC)، عصارههای الکلی و آبی، از پلیت‌های ۹۶ چاهکی استریل با روش رقیق‌سازی در محیط مایع (Microdilution broth) استفاده شد. در داخل هر کدام از ده چاهک در ردیف‌های اول تا سوم پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت آبگوشت مغذی ریخته شده و سپس به اولین چاهک هر ردیف، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره از غلظتی که به روش انتشار دیسک اثر ضدمیکروبی آن مشخص شده بود، اضافه شد. پس از چند بار مخلوط کردن محتویات اولین چاهک هر ردیف، ۱۰۰ میکرولیتر از آن را برداشته و به چاهک دوم اضافه شد. این عمل تا انتها (چاهک دهم) ادامه یافت و از آخرین چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر خارج گردید. در پایان، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با غلظت 10^8 CFU/ml، به هرکدام از چاهک‌ها اضافه شده و سپس، پلیت با تکان نود دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. پس از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک‌ها (در مقایسه با چاهک‌های کنترل) به صورت چشمی بررسی شده و جذب نوری توسط دستگاه الایزاخوان (Elisa reader) (Technology-Stat Fax® 3200 Microplate Reader, USA Awareness) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید و میانگین داده‌های به‌دست‌آمده به عنوان نتایج حداقل غلظت بازدارندگی ارائه شد. حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری توسط عصاره، کم‌ترین غلظتی است که در آن کدورت مشاهده نشده است. چاهک‌های ۱۱ (حاوی محیط کشت بدون باکتری و عصاره) و ۱۲ (محیط کشت همراه با باکتری) به ترتیب به عنوان شاهدهای منفی و مثبت در نظر گرفته شدند (Amiri & Jumapour 2015). پس از کشت محتویات هر کدام از چاهک‌ها، کمترین رقتی که باعث مرگ ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها شد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration=MBC) تعیین گردید (Sancholi et al. 2011, Skocibusic & Bezic 2004).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی موثرترین عصاره‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو عصاره با غلظت موثرتر بافتهای توت آمریکایی با استفاده از ماده ۲ و۲ دی

فنیل -۱-پیکریل هیدرازیل که ترکیبی بنفش‌رنگ است، ارزیابی شدند. بر این اساس ۵۰ میکرولیتر از عصاره با پنج میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۴ درصد ماده فوق در متانول، مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و۲ دی فنیل -۱-پیکریل هیدرازیل با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Dehghani Bidgoli 2023,Burits & Bucar 2000) .

$$SC = [(AO – AS) / AO]\times100$$

AO = جذب کنترل (حاوی تمام واکنشگرها به غیر از نمونه آزمایش)، AS = جذب نمونه آزمایش، SC ٪= درصد مهار رادیکال آزاد

تعیین میزان فنل‌کل موثرترین عصاره‌ها

مقادیر فنل کل دو عصاره با غلظت موثرتر به روش رنگ‌سنجی سیورس و دالی (Seevers & Daly 1970) و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (Orhan et al. 2016). بدین‌منظور، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر با ۲۵ میلی‌لیتر واکنشگر ۰/۲ نرمال فولین سیوکالتیو مخلوط و به مدت پنج دقیقه هم زده شد. پس از افزودن دو میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به نمونه‌ها و قرار دادن آن‌ها به مدت دو ساعت در دمای اتاق، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر فنل کل عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره اندازه‌گیری شد (Ebrahimzadeh et al. 2008).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با نرم‌افزار JMP نسخه ۸، تجزیه واریانس شدند و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار اکسل استفاده شد (Afshar Mohammadian et al. 2015).

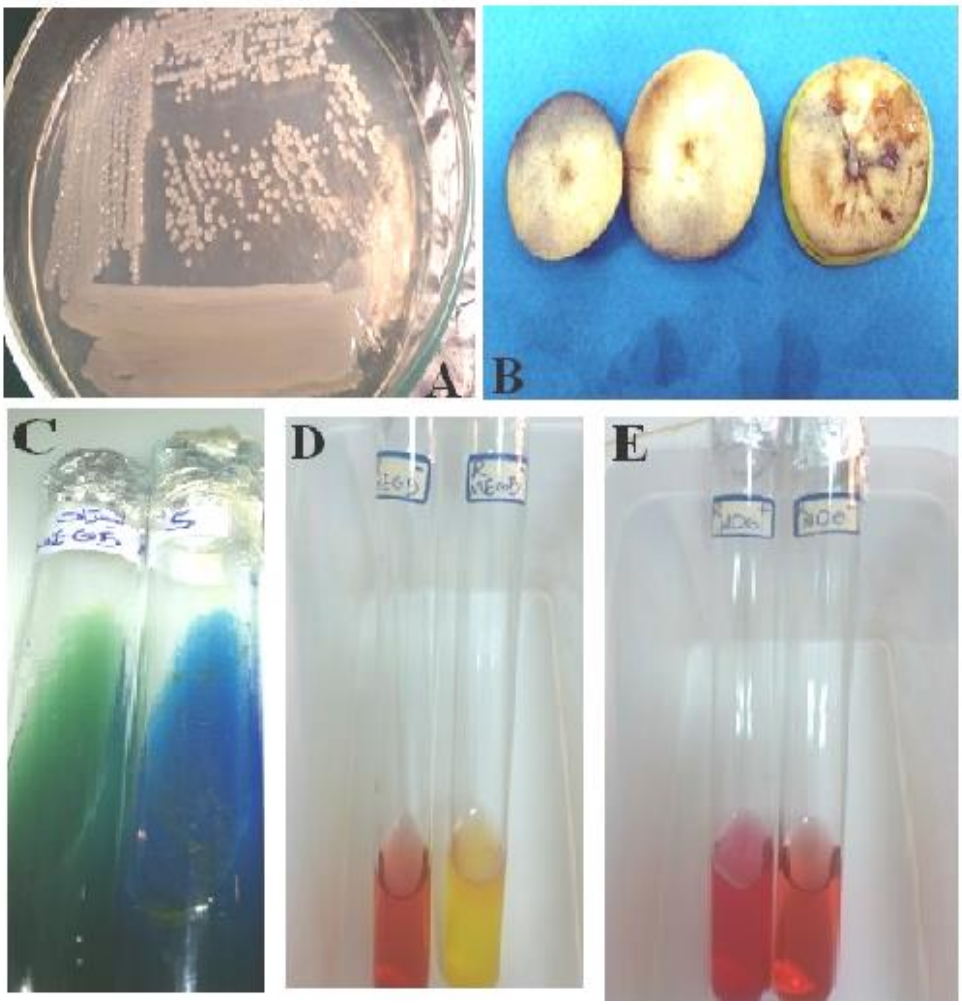
یافته‌ها و بحث Results and Discussion

ویژگی‌های جدایه *Erwinia amylovora*

کلنی‌های جدایه مورد مطالعه بر روی محیط کشت آگار مغذی حاوی نیم درصد ساکاروز به رنگ متمایل به سفید، کروی و برجسته (گنبدی شکل) بودند و این جدایه توانست بر روی میوه نارس گلابی، بافت‌مردگی ایجاد نموده و ترشحات باکتریایی تولید کند. علاوه‌براین، نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های استفاده از سیترات، سوربیتول و رافینوز نشان داد که این جدایه توانایی استفاده از سیترات و سوربیتول را داشته ولی قادر به استفاده از رافینوز نیست (شکل ۱). این ویژگی‌ها با خصوصیات و ویژگی‌های *E. amylovora* مطابقت دارد (Donat et al. 2005, Niknejad Kazempour et al. 2006, Thapa et al. 2012, EPPO 2013, Tafifet et al. 2020, Hassan et al. 2023).

تاثیر عصاره‌های اتانولی و آبی میوه و برگ توت آمریکایی بر رشد کلنی باکتری

تجزیه واریانس داده‌های این آزمایش نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که عصاره اتانولی میوه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با دیگر عصاره‌های مورد آزمایش، بیش‌ترین قطر هاله بازداری (۵/۵۷ میلی‌متر) و بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی علیه *E. amylovora* را دارد، درحالی‌که عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و عصاره آبی میوه، در دیگر غلظت های مورد آزمایش، فاقد اثر ضدباکتریایی بوده و یا اثر ناچیزی داشتند (جدول ۱).



شکل ۱. خصوصیات جدایه *Erwinia amylovora* استفاده شده در این پـژوهش، A. شـکل کلنی‌هـا روی محیط کشت آگار غذایی، B. بیماری‌زایی روی میوه نارس گلابی، C، D و E. به ترتیب استفاده از سیترات، سوربیتول و رافینوز.

Figure 1. Characteristics of *Erwinia amylovora* isolate used in this research, A. Form of colonies on food agar culture medium, B. Pathogenicity on unripe pear fruit, C, D and E. using citrate, sorbitol and raffinose respectively.

جدول ۱. میانگین قطر هاله بـازداری (میلی‌متـر) از رشـد کلنـی *Erwinia amylovora* در غلظتهـای مختلف عصاره‌های آبی و اتانولی برگ و میوه توت آمریکایی (سه غلظت*)

Table 1. The average diameter of the inhibition zone (mm) of *Erwinia amylovora* colony growth in different concentrations of aqueous and ethanolic extracts of Osage orange (*three concentrations)

عصاره Extraction	غلظت‌ها Concentration (mg/ml)		
	250	500	1000
Aqueous leaf extract	0	0	0.6±0.1
Ethanolic extract of leaf	0	0.3±0.1	0.4±0.1
Aqueous fruit extract	0	0	0.7±0.1
Ethanolic extract of fruit	0	0.6±0.1	5.57±0.1

❋ چون تاثیر سایر غلظت‌ها همانند غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر بوه است، بنابراین از ذکر تاثیر آن‌ها در این جدول ذکر نشده است.

* Because the effect of other concentrations was the same as the concentration of 250 mg/ml, so their effect is not mentioned in this table.

استفاده از روش انتشار در دیسک برای بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها، اولین بار توسط کیربی (Kirby) و همکارانش (۱۹۵۷) انجام شد و امروزه استفاده از این روش در ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصارههای گیاهی علیه بیمارگرهای گیاهی کاربرد فراوان دارد (Bubonja-Šonje et al. 2020). اثر کنترل‌کنندگی عصاره میوه توت آمریکایی بر *E. amylovore*، اثبات‌کننده خاصیت ضدباکتریایی عصاره مزبور است. محققین در مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره اتانولی میوه توت آمریکایی در کنترل باکتری *Pseudomonas syringae* نیز موثر است (Ríos-Herrera et al. 2021). اثر بازدارندگی عصاره اتانولی میوه توت آمریکایی در غلظتهای بالاتر و عدم تاثیر عصاره آبی، به نظر می‌رسد به دلیل گرم منفی بودن باکتری *E. amylovora* باشد و احتمالا داشتن غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی، می‌تواند دلیلی بر مقاوم‌تر بودن این دسته از بیمارگرها باشد. در مطالعه‌ای دیگر، ضمن بررسی مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، این موضوع مورد بحث قرار گرفته است (Partridge 2011). از نتایج به‌دست‌آمده با توجه به قدرت بازدارندگی و کنترل‌کنندگی در غلظت‌های بالاتر، می‌توان این‌گونه ارزیابی کرد که قدرت بازدارندگی عصاره‌های مورد آزمایش بر باکتری‌های گرم منفی پایین‌تر بوده که با نتایج مطالعه فیلیپ و همکاران (Filip et al. 2021) که فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی برگ توت آمریکایی را بررسی کردند و تاثیر بیشتر بازدارندگی را بر باکتری های گرم مثبت و مخمرها نشان دادند همخوانی دارد. بر پایه نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش، این‌گونه استنباط می‌شود که نوع حلال به کار رفته در استخراج مواد موثره، اثر مستقیم بر قدرت ضدباکتریایی عصاره دارد. بدین ترتیب، بهترین عملکرد از عصاره اتانولی به دست آمد. تاثیر نوع حلال به کار رفته

در استخراج ترکیبهای ضد باکتریایی سایر عصاره‌های گیاهی نیز این موضوع تایید شده است (Parveen & Anerjan 2016).

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

اثرات ضدباکتریایی عصاره میوه و برگ درخت توت آمریکایی با اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. کم‌ترین غلظت بازدارندگی برای عصاره اتانولی میوه درخت توت آمریکایی ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی نیز محاسبه گردید و برای عصاره اتانولی میوه، ۵۰۰ میلی‌گرم برمیلی لیتر تعیین گردید. روش سری رقت در میکروپلیت، برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارندگی و در ادامه آن تعیین کم‌ترین غلظت کشندگی، روشی دقیق و حساس می‌باشد و برای آزمایش خواص ضدمیکروبی سایر عصاره‌های گیاهی نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Scorzoni et al. 2007). اثر بازدارندگی برخی عصاره‌های گیاهان دارویی نیز با استفاده از این روش روی *E. amylovora* تعیین شده است (Akhlaghi et al. 2020).

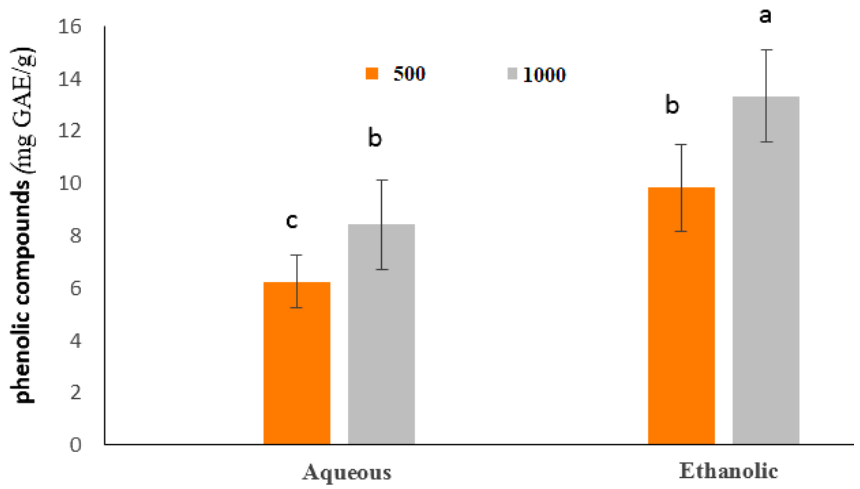
فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

تجزیه واریانس دادههای فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظتهای مختلف این عصارهها و اثرات اصلی و متقابل اندام گیاهی، عصاره و غلظت آن بر صفت مذکور نشان داد که بین آنها در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. مقایسه میانگین و برهمکنش سه گانه اندام گیاهی، نوع عصاره و غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر عصاره اتانولی میوه با میانگین ۴۲درصد، بیش‌ترین مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. همچنین عصاره آبی برگ نیز با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر بعد از شاهد، کم‌ترین مقدار را نشان داد. تیمار شاهد (بدون عصاره) نیز هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان نداد.

براساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت که حلال به‌کاررفته در فرایند عصاره‌گیری، بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز تاثیر دارد و در مقایسه بین عصاره‌های برگ و میوه، عصاره میوه دارای سطوح بالاتری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده است. مطالعه دادایان و همکاران (Dadayan et al. 2021) روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره میوه توت آمریکایی نیز نشان داده که میوه این درخت یک منبع آنتی‌اکسیدانی قوی است. اورهان و همکاران (Orhan et al. 2016) نیز در مطالعه‌ای سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه را بررسی کردند و بالاتر بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی را تایید کردند.

میزان فنل کل موجود در عصاره‌ها

تجزیه واریانس داده‌های فنل کل عصاره‌ها نشان داد که اثرات اصلی و متقابل اندام گیاهی، نوع عصاره و غلظت آن بر صفت مذکور در سطح احتمال ۱ ٪ معنی‌دار است. مقایسه میانگین برهمکنش دوگانه نوع عصاره و غلظت بر میزان فنل کل نشان داد که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر عصاره اتانولی



شکل ۲. میزان فنل کل موجود در عصاره‌های اتانولی و آبی میوه توت آمریکایی در دو غلظت موثرتر(میلی‌گرم/میلی‌لیتر).

Figure 2. Total phenol amount of in ethanolic and aqueous extracts of Osage orange fruit in two more effective concentrations (mg/ml).

میوه با میانگین ۱۳/۳۲ درصد، بیش‌ترین مقادیر فنل کل را دارد (شکل ۲).

نتیجه‌گیری
Conclusion

یافته‌های بدست آمده از میزان هاله بازداری و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی مشخص شد که در بین عصاره‌های اتانولی و آبی برگ و میوه درخت توت آمریکایی، بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره اتانولی میوه و در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر است. همچنین ثابت شد که نوع حلال به کاررفته در تهیه عصاره گیاهی، در استخراج مواد موثره و ترکیبهای فنلی و همچنین میزان این ترکیبهای در عصاره به‌دست‌آمده، تاثیر مستقیمی بر خاصیت ضدباکتریایی عصاره گیاهی، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل آن دارد. بنابراین می‌توان اثر بازدارندگی بیشتر عصاره اتانولی میوه توت آمریکایی بر *E. amylovora* را به دلیل دارا بودن سطح بالاتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل دانست و می‌توان آنرا به عنوان یک ترکیب طبیعی برای مدیریت بیماری در نظر گرفت.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است، بنابراین نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از کمک‌های صورت گرفته سپاس‌گزاری نمایند. هم چنین از زحمات جناب آقای دکتر سعید طریقی کمال تشکر را دارند.

References منابع

1. Afshar Mohammadian, M., Kurdi, Sh. & Mashhadinejad, A. (2015). Antibacterial activity of stigma and petal extracts of different species of saffron (*Crocus* spp.). *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)* 29(3), 265-273. (In Persian)
2. Akhlaghi, M., Tarighi, S. & Taheri, P. (2020). Effects of plant essential oils on growth and virulence factors of *Erwinia amylovora*. *Journal of Plant Pathology*, 102, 409-419.
3. Amiri, A. & Jomehpour, N. (2015). Evaluation the effect of antibacterial of *Ferula assa -foetida* L., *Carum copticum*, *Mentha piperita* L. hydroalcoholic extract on standard sensitive and methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157H7 and *Salmonella typhimurium*. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 24(2), 72-79. (In Persian)
4. Arafat, A. H., Hanan, S. A. & Rabab, A. M. (2015). Antibacterial activity of antagonistic bacteria and plant extract on *Erwinia amylovora* the pathogen of fire blight disease in Egypt. *International Journal of Phytopathology, 4 (2),* 73-79.
5. Baysal, O., Laux, P. & Zeller, W. (2002). Studies on induced resistance (IR) effect of the plant extract (*Hedera helix*) against fire blight. In: APS plant pathology meeting, international conference in plant pathology Caribbean division in Cuba p. 82.
6. Bubonja-Šonje, M., Knežević, S. & Abram, M. (2020). Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 71(4), 300-311.
7. Burits, M. & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14(5), 323-328.
8. Canli, K., Bozyel, M. E. & Altuner, E. M. (2017). In vitro antimicrobial activity screening of *Maclura pomifera* fruits against wide range of microorganisms. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 6(8), 19-22.
9. Coder, K. D. (2024). Osage-orange – *Maclura pomifera* a traveling tree. University of Georgia, Warnell School of Forestry & Natural Resources. Publication WSFNR-24-09C.
10. Dadayan, A. S., Stepanyan, L. A., Sargsyan, T. H., Hovhannisyan, A. M. & Dadayan, S. A. (2021). Quantitative analysis of biologically active substances and the investigation of antioxidant and antimicrobial activities of some extracts of Osage orange fruits. *Pharmacia*, 68(4), 731-739.
11. Dehghani Bidgoli, R., Abdullah, F. O., Budriesi, R., Mattioli, L. B., Spadoni, G., Mari, M. & Micucci, M. (2023). Essential oil chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Eucalyptus largiflorens* F. Muell. *Polish Journal of Environmental Studies*, 32, 3043-3052.
12. Deresa, E. M. & Diriba, T. F. (2023). Phytochemicals as alternative fungicides for controlling plant diseases: A comprehensive review of their efficacy, commercial representatives, advantages, challenges for adoption, and possible solutions. *Heliyon*, 9(3), e13810.
13. Donat, V., Biosca, E. G., Rico, A., Penalver, J., Borruel, M., Berra, D., Basterretxea, T., Murillo, J. & Lopez, M. M. (2005). *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic characteristics. *Annals of Applied Biology*, 146, 105-114.

14. Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of biology*, 32(1), 43-49.
15. Fatnassi, S., Zarrouk, H. & Chatti, S. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile fraction of the peel of *Maclura pomifera* fruit growing in Tunisia. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 13, 1-6.
16. Filip, S., Tomić, A., Ranitovic, A., Durovic, S., Blagojevic, S. & Zekovic, Z. p. (2019). Antimicrobial activity of *Maclura pomifera* dry extracts. 1st International Conference on Advanced Production and Processing. Novi Sad, Serbia.
17. Filip, S., Đurović, S., Blagojević, S., Tomić, A., Ranitović, A., Gašić, U., Tešić, Z. & Zeković, Z. (2021). Chemical composition and antimicrobial activity of Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf extracts. *Archiv der Pharmazie*, 354(2), e2000195.
18. Gusberti, M., Klemm, U., Meier, M. S., Maurhofer, M. & Hunger-Glaser, I. (2015). Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 11422-11447.
19. Hafez, Y. M., Salama, A., Kotb, H., Moussa, Z., Elsaed, N., El-Kady, E. M., Fahmy, A. S. & Hassan, S. (2021). The influence of nano-copper and safety compounds on vegetative growth, yield and fruit quality of "Le Conte" pear trees under infection with fire blight. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30, 6237-6247.
20. Harley, J. P. (2013). Laboratory exercises in microbiology, 9th edition. McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY, 512 pp.
21. Hassan, W., Ahmed, O., Hassan, R. E., Youssef, A. A. & Shalaby, A. A. (2023). Isolation and characterization of three bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agent. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33, 60.
22. Hermann, S., Orlik, M., Boevink, P., Stein, E., Scherf, A., Kleeberg, I., Schmitt, A. & Schikora, A. (2022). Biocontrol of plant diseases using *Glycyrrhiza glabra* leaf extract. *Plant Disease*, 106 (12), 3133-3144.
23. Iacobellis, N. S., Lo Cantore, P., Capasso, F. & Senatore, F. (2005). Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 57-61.
24. Jones, A. & Geider, K. (2001). II Gram negative bacteria. B. Erwinia and Pantoea. In: N. W. Schaad, J. B. Jones & W. Chum (Eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. APS Press, St Paul, USA, 398 pp.
25. Kim, W. S., Gardan, L., Rhim, S. L. & Geider, K. (1999). *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 899-906.
26. Kim, W. S., Jock, S., Rhim, S. L. & Geider, K. (2001). Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease*, 85, 1183-1188.
27. Kirby, W. M. M., Yoshihara, G. M., Sundsted, K. S. & Warren, J. H. (1957). Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics Annual*, 892, 1956-1957.
28. MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 912 pp.
29. Mortazavi, S. H., Azadmard-damirchi, S., Mahmudi, R., Sowti, M., and Mahamoudi, R. (2015). Chemical composition and antioxidant properties of hull and core of

Pistacia khinjuk stocks. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(4), 408-419. (In Persian with English abstract)
30. Niknejad Kazempour, M., Kamran, E. & Ali, B. (2006). *Erwinia amylovora* causing fire blight of pear in the Guilan province of Iran. *Journal of Plant Pathology*, 88, 113-116.
31. Orhan, I. E., Senol, F. S., Demirci, B., Dvorska, M., Smejkal, K. & Zemlicka, M. (2016). Antioxidant potential of some natural and semi-synthetic flavonoid derivatives and the extracts from *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider (Osage orange) and its essential oil composition. *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(6), 403-411.
32. Partridge, S. R. (2011). Analysis of antibiotic resistance regions in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 820-855.
33. Parveen, A. & Anerjan, N. (2018). Evaluation of the effect of extracting solvent on antibacterial and antifungal properties of green tea. *Journal of Food Hygiene*, 7(28), 71-79. (In Persian with English abstract)
34. Paulin, J. P. (2000). *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In: J. Vanneste (Ed.). Fire blight, the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI, Wallingford, UK, 370 pp.
35. Ríos-Herrera, N. E., García-Munguía, A. M., Hernández-Bautista, O. & García-Munguía, C. A. (2021). Antimicrobial activity of extracts of *Zingiber officinale* and *Maclura pomifera* on *Pseudomona syringae*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(2), 247-262.
36. Roselló, M., García-Vidal, S., Tarín, A., Llop, P., Gorris, M. T., Donat, V., Peñalver, J., Chartier, R., Paulin, J. P., Gardan, L. & López, M. M. (2002). Characterization of an *Erwinia* sp. isolated from necrotic pear blossoms in Valencia, Spain. *Acta Horticulturae*, 590, 139-142.
37. Sainz-Hernández, J. C., Rueda-Puente, E. O., Cornejo-Ramírez, Y. I., Bernal-Mercado, A. T., González-Ocampo, H. A. & López-Corona, B. E. (2023). Biological application of the allopathic characteristics of the Genus *Maclura*: A review. *Plants*, *12*, 3480.
38. Sancholi, N., Ghafari, M. & Qaraeie, A. (2011). Antibacterial effects of several plant essential oils on *Vibrio alginolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* bacteria. Journal of Comparative Pathobiology, 38, 749-754. (In Persian)
39. Saneinasab, S., Hosseinipour, A., Majidi, F. & Masoumi, M. (2015). In vitro antibacterial activity of some plant extracts against *Erwinia amylovora*. In: 1th International and 9th National biotechnology congress of Islamic Republic of Iran, May 24-26. Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
40. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN., USA, 373 pp.
41. Scorzoni, L., Benaducci, T., Almeida, A. M. F., Silva, D. H. S., Bolzani, V. S. & Mendes-Giannini, M. J. S. (2007). Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 25-34.
42. Seevers, P. M. & Daly, J. M. (1970). Studies on wheat stem rust resistance controlled at the Sr6 locus. I. The role of phenolic compounds. *Phytopathology*, 60(9), 1322-1328.

43. Skocibusic, M. & Bezic, N. (2004). Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two Satureja species essential oils. *Phytotherapy Research, 18(12),* 967-970.
44. Suslow, T. V., Schroth, M. N. & Isaka, M. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology, 72,* 917-918.
45. Tafifet, L., Raio, A., Holeva, M., Dikhai, R., Kouskoussa, C. O., Cesbron, S. & Krimi, Z. (2020). Molecular characterization of Algerian *Erwinia amylovora* strains by VNTR analysis and biocontrol efficacy of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas brassicacearum* antagonists. *European Journal of Plant Pathology, 156 (3),* 867-883.
46. Thapa, S. P., Cho, S. Y. & Lim, C. K. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia rhapontici* isolated from diseased Asian pear fruit trees. *Phytoparasitica, 40,* 507-514.
47. Tsao, R., Yang, R. & Young, J. C. (2003). Antioxidant isoflavones in Osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(22),* 6445-6451.
48. Vanneste, J. L. (2000). Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing.
49. Zeller, W. & Laux, P. (2006). Biocontrol of fire blight with the bacterial antagonist *Rhanella aquatilis* RA39 in combination with aromatic compounds. *Acta Horticulturae, 704,* 341-344.