

مقاله‌ی کوتاه علمی

اثر چند ترکیب گیاهی در مهار آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در محیط کشت‌های ریزازدیادی گیاهان

زهرا افتخاری^۱، اسماعیل چمنی^۱، محمود باقری خیرآبادی^۱، فروغ الدین زرگزاده^۲، مهدی داوری^۲

۱- گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه محقق اردبیلی

مسئول مکاتبات: مهدی داوری، پست الکترونیک: mdavari@uma.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۱۸

۴ (۱) ۷۹-۸۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۱۰

چکیده

در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان پیازی، وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مشکلات اساسی می‌باشند که می‌توانند کارایی این نوع روش‌های تکثیری را تحت تأثیر قرار دهند. به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیبات گیاهی در رفع این قبیل آلودگی‌ها از محیط کشت گیاه پیازی لاله واژگون، سه آزمایش به‌طور جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف اس- کاروون، تیمول و کارواکرول بود. بین تیمارها از لحاظ بازدارندگی از آلودگی‌های قارچی و باکتریایی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد وجود داشت، به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰ ppm کارواکرول و ۱۵۰ ppm تیمول بازدارندگی کامل از رشد قارچ *Alternaria sp.* را نشان داد. همچنین رشد باکتری *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* با چگالی نوری ۰/۱-۰/۲ در غلظت ۲۰۰ ppm کارواکرول و تیمول و نیز در چگالی نوری ۲ با غلظت ۳۰۰ ppm تیمول و ۴۰۰ ppm کارواکرول به‌طور کامل متوقف شد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که استفاده از ترکیبات گیاهی تیمول و کارواکرول می‌تواند در کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی محیط کشت ریزازدیادی گیاهان پیازی از جمله لاله واژگون مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: تیمول، کارواکرول، کشت بافت، گیاهان پیازی، *Pectobacterium carotovora*، *Alternaria sp.*

مقدمه

پژوهش حاضر تأثیر سه ترکیب گیاهی به‌نام اس- کاروون، تیمول و کارواکرول در رفع آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از محیط کشت ریزازدیادی لاله واژگون مطالعه شد.

مواد و روش‌های پژوهش

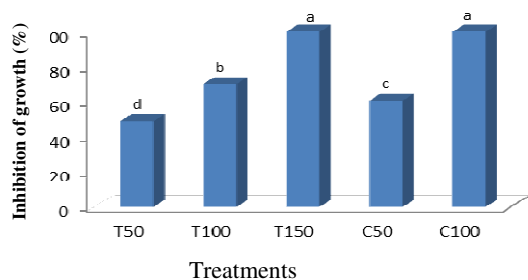
ترکیبات گیاهی مورد استفاده شامل اس- کاروون، تیمول و کارواکرول از شرکت سیگما خریداری و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند. برای تهیه‌ی محلول پایه ترکیبات گیاهی، از NaOH (1N) برای حل کردن ترکیبات گیاهی استفاده شد و اسیدیته محیط کشت گیاهی در سطح ۵/۸ تنظیم شد. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف اس- کاروون (۵۰، ۱۰۰،

آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مهم‌ترین عوامل مشکل‌ساز در روش‌های مختلف کشت درون‌شیشه‌ای می‌باشند. از جمله این عوامل می‌توان به قارچ‌های جنس *Penicillium*، *Aspergillus*، *Alternaria* و باکتری‌های *Pectobacterium*، *Erwinia* و *Ralstonia* اشاره نمود (Oduyayo et al., 2007). برای جلوگیری از این نوع آلودگی‌ها برخی ترکیبات گیاهی در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به‌نظر می‌رسد کاربرد ترکیبات با منشاء گیاهی و با خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی در محیط کشت درون‌شیشه‌ای می‌تواند میزان آلودگی را تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش دهد. بر همین اساس، در

با استفاده از قطره چکان به یک اندازه (سه قطره) در محیط- های کشت MS جامد حاوی غلظت های متفاوت ترکیبات گیاهی فوق و با استفاده از لوپ سترون به صورت مخطط مایه زنی شد و محیط های کشت به طور روزانه مورد بازرسی قرار گرفتند. میزان بازدارندگی سه ترکیب گیاهی از رشد قارچ و باکتری مورد آزمون با بهره گیری از فرمول (1982) Pandey *et al.* تعیین شد. داده ها با استفاده از تبدیل جذری $\sqrt{X + 0.5}$ نرمال سازی شده و سپس با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمون مقایسه ی میانگین دانکن در سطح احتمال ۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، غلظت های مختلف اس- کاروون در برطرف کردن آلودگی های قارچی و باکتریایی اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان ندادند و بنابراین از تجزیه و تحلیل نتایج حذف شدند. نتایج حاصل از تجزیه ی واریانس نشان داد که اثر تیمول و کارواکرول در بازدارندگی از رشد قارچ *Alternaria sp.* در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. غلظت های بیشتر از ۱۰۰ و ۱۵۰ قسمت در میلیون به ترتیب در کارواکرول و تیمول باعث جلوگیری کامل از رشد آلودگی قارچی مذکور شدند (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر تیمار ترکیبات گیاهی در بازدارندگی از رشد قارچ *Alternaria sp.* (T= تیمول، C= کارواکرول).

Fig. 1. The effect of herbal compound treatments in inhibition of *Alternaria sp.* growth (T= Thymol, C= Carvacrol).

۱۵۰، ۲۰۰، ... ppm (۱۰۰۰)، تیمول (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ ppm) و کارواکرول (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ ppm) تهیه شد. پس از استقرار ریز نمونه ها در محیط کشت، تشتک های پتری در اتاقک های رشد با دمای 24 ± 2 سلسیوس با شدت نوری ۶۰-۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

به منظور ارزیابی اثر ضدقارچی ترکیبات گیاهی، یکی از قارچ های آلوده کننده متداول از محیط کشت MS حاوی ریزنمونه های پیاز لاله واژگون جداسازی و پس از خالص سازی با روش تک اسپور با استفاده از ویژگی های ریخت شناسختی و مطابق کلید Barnett & Hunter (1998) به عنوان جنس قارچی *Alternaria* تشخیص داده شد. سپس یک دیسک قارچی به قطر ۵ میلی متر از حاشیه پرگنه هفت روزه به کمک چوب پنبه سوراخ کن سترون در محیط MS حاوی غلظت های مختلف ترکیبات گیاهی اس- کاروون، تیمول و کارواکرول مایه زنی شد. بعد از گذشت پنج روز، محیط های کشت به طور روزانه کنترل شده و تغییرات یادداشت شد. درصد بازدارندگی غلظت های مختلف ترکیبات گیاهی با بهره گیری از فرمول ارایه شده توسط Pandey *et al.* (1982) محاسبه شد: $GI \% = (dc - dt/dc) \times 100$ = بازدارندگی از رشد، dc = میانگین قطر رشد قارچ در شاهد، dt = میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد بررسی (میلی متر).

به منظور ارزیابی اثر ضدباکتریایی ترکیبات گیاهی از جدایه استاندارد باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* شماره PTCC No. 1675 که از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه شده بود، استفاده شد. برای مایه زنی باکتری به محیط های کشت حاوی ترکیبات گیاهی، از کشت تازه باکتری، سوسپانسیون تهیه شد. رقت سنجی سوسپانسیون باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام گرفت. برای رقیق سازی سوسپانسیون به منظور رسیدن به چگالی نوری (OD: optical density or absorbance) ۰/۲، ۰/۱-۰/۱ از آب مقطر سترون استفاده شد. از سوسپانسیون های آماده شده

به‌طور کلی در این پژوهش، اس-کاروون تأثیر معنی‌داری روی قارچ و باکتری مورد آزمایش نشان نداد و بنابراین از تجزیه و تحلیل داده‌ها حذف شد، اما دو ترکیب کارواکرول و تیمول، تأثیر بازدارندگی مناسبی روی این دو میکروارگانیسم نشان دادند. مقایسه اثر دو ترکیب نیز نشان می‌دهد که کارواکرول به‌مراتب بهتر از تیمول عمل نموده است. این دو ماده جزو ترکیبات فنلی و از عوامل قوی ضد میکروبی هستند (Castillo et al., 2014). این ترکیبات هم در غشای سلول نفوذ می‌کنند و هم می‌توانند در لخته شدن محتویات سلول نقش داشته باشند (Dorman & Dean, 2000). تحقیقات مختلف نشان داده است که اسانس آویشن شیرازی دارای هر دو ماده مؤثره تیمول و کارواکرول می‌باشد. (Karami-Osboo et al., 2010) در بررسی اثر اسانس آویشن و مواد مؤثره این دو ترکیب گیاهی بر باکتری *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow به‌این نتیجه رسیدند که تیمول قوی‌تر عمل می‌کند که با نتیجه پژوهش حاضر کمی متفاوت است. در پژوهشی، فعالیت ضد باکتریایی تیمول در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفته که باعث مهار باکتری *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi در آگار شده است (Momol et al., 2000). در مطالعات (Elansary et al., 2012)، اثرات ضد میکروبی برگ سه گیاه جمبو، زربین و شاه‌پسند در خنجه‌ای روی برخی باکتری‌ها از جمله *P. carotovora* مشاهده و معلوم شده است که در بین آن‌ها اثر گیاه جمبو به دلیل دارا بودن α -pinene بیشتر از بقیه بود.

در ارزیابی اثرات پنج گیاه دارویی بومی ایران روی *P. carotovora* نیز مشخص شده است که آویشن معمولی (*Thymus vulgaris* L.) قوی‌تر از سایر گیاهان عمل می‌کند و این برتری را به وجود کارواکرول در این گیاه نسبت داده‌اند (Mehrsorosh et al., 2014) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. همچنین در آزمایشی، تیمول در غلظت ۲۴/۵ میکرولیتر در ۲۰ میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰٪ باعث جلوگیری از

براساس نتایج به‌دست آمده، کارواکرول با غلظت ۱۰۰-۵۰ ppm باعث کاهش رشد ۱۰۰-۶۰/۷۲ درصدی و تیمول با غلظت ۱۵۰-۵۰ ppm باعث کاهش رشد ۱۰۰-۴۸/۹۷ درصدی آلودگی قارچی شد (جدول ۱). جدول ۱- مقایسه‌ی میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Alternaria* sp. توسط ترکیبات گیاهی تیمول و کارواکرول.

Table 1. Mean comparison of inhibitory percentage of *Alternaria* sp. growth rate (%).

Inhibitory growth rate \pm SE		Concentrations (ppm)
Thymol	Carvacrol	
48.97 \pm 0.94d	60.72 \pm 1.31c	50
70.07 \pm 0.44b	100 \pm 00a	100
100 \pm 00a	100 \pm 00a	150

میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

تیمول با غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ قسمت در میلیون (جدول ۲) به ترتیب در دو رقت باکتری با چگالی نوری ۰/۱-۰/۲ و ۰/۲-۰/۳ کارواکرول با غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون (جدول ۳) به ترتیب در دو رقت فوق باعث بازدارندگی کامل از رشد باکتری مورد بررسی در محیط کشت MS شد.

جدول ۲- قابلیت بازدارندگی غلظت‌های مختلف تیمول در رشد باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* در رقت‌های مختلف.

Table 2. Inhibition of bacterial growth at different concentrations of Thymol.

Pure colony	Bacteria dilutions			Thymol concentrations (ppm)
	OD: 2	OD: 0.1-0.2		
-	-	-		50
-	-	-		150
-	-	+		200
-	-	+		250
-	+	+		300

+ بازدارندگی از رشد باکتری، - عدم بازدارندگی از رشد باکتری، OD: چگالی نوری.

+ Inhibition of bacterial growth, - Non-Inhibition of bacterial growth, OD: optical density.

قارچ ها مؤثرند و بیشترین کارایی به کارواکرول اختصاص داشت (Abbaszadeh et al., 2014). خاصیت کارواکرول در افزایش ماندگاری لیمو به دلیل کاهش قارچ ها و میکروب های عامل فساد میوه نیز به اثبات رسیده است (Castillo et al., 2014). نتایج پژوهش حاضر نیز استفاده از ترکیبات گیاهی را در ممانعت از آلودگی های قارچی و باکتریایی محیط کشت های ریزازدیادی گیاهی به صورت موفقیت آمیز نشان داد و به نظر می رسد این ترکیبات گیاهی به ویژه کارواکرول می تواند خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی را به اشکال مختلف و کاربردهای متنوع نشان دهد. استفاده از ترکیبات گیاهی و مواد زیستی در مهار آفات و بیماری های گیاهی به جای مواد شیمیایی چند سالی است که در تحقیقات گیاه پزشکی جایگاه مناسبی پیدا کرده است، اما کنترل آلودگی های قارچی و باکتریایی در کشت بافت و ریزازدیادی را شاید بتوان به عنوان عملی ترین موارد استفاده از این ترکیبات برشمرد. ضمناً غلظت های پایین تیمول و کارواکرول تأثیر مثبت بر پارامترهای رشدی از جمله تعداد پیازچه، ریشه و برگ داشت، اما در غلظت های بالا کاهش رشد و گیاه سوزی مشاهده شد (نتایج در دست انتشار). طبق نتایج این پژوهش می توان امیدوار بود که به جای استفاده از ترکیبات شیمیایی برای برطرف کردن این آلودگی ها از ترکیبات گیاهی طبیعی که خوشبختانه زمینه تهیه و تولید مواد اولیه آن ها در کشور ما فراهم است، استفاده نمود. ترکیبات گیاهی با وجود قیمت تمام شده بالاتر در مقایسه با قارچ کش ها و باکتری کش ها به دلیل تأثیر در غلظت بسیار پایین، توجیه اقتصادی مناسبی نیز دارند.

رشد قارچ *Penicillium expansum* Link. شده است (Neri et al., 2006). در تحقیق (Perina et al., 2014)، اسانس *T. vulgaris* و ماده تیمول به ترتیب با حداقل بازدارندگی ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانستند از رشد *A. alternata* ممانعت به عمل آورند، در حالی که حداقل غلظت بازدارندگی قارچ کش تجاری مورد بررسی، ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

جدول ۳- قابلیت بازدارندگی غلظت های مختلف کارواکرول در رشد باکتری *P. carotovorum* subsp. در رقت های مختلف.

Table 3. Inhibition of bacterial growth at different concentrations of Carvacrol.

Bacteria dilutions			
Pure colony	OD:2	OD:0.1-0.2	Carvacrol concentrations (ppm)
—	—	—	50
—	—	—	150
—	—	+	200
—	—	+	250
—	—	+	300
—	—	+	350
—	+	+	400

+ بازدارندگی کامل از رشد باکتری، - عدم بازدارندگی از رشد باکتری، OD: چگالی نوری.

+ Inhibition of bacterial growth, - Non-Inhibition of bacterial growth, OD: optical density.

در تحقیقی، خاصیت ضد قارچی تیمول، کارواکرول، ائوگونول و منتول در کنترل رشد قارچ های آلوده کننده غذا ارزیابی شد و معلوم شد که ترکیبات فوق علیه این نوع

References

- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R., & Abbaszadeh, A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 24(2): 51-56.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B., 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th Edition. APS Press, St. Paul Minnesota, USA. 218 pp.

- Castillo, S., Pérez-Alfonso, C.O., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Serrano, M. & Valero, D. 2014. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control*, 35(1): 132-136.
- Dorman, H.J.D. & Dean, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308- 316.
- Elansary, H.O., Salem, M.Z., Ashmawy, N.A., & Yacout, M.M. 2012. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaves essential oils from *Syzygium cumini* L., *Cupressus sempervirens* L. and *Lantana camara* L. from Egypt. *Journal of Agricultural Science*, 4(10), p144.
- Karami-Osboo, R., Khodaverdi, M. & Aliakbari, F. 2010. Antibacterial effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 12: 35-45.
- Mehrsorosh, H., Gavanji, S., Larki, B., Mohammadi, M. D., Karbasiun, A., Bakhtari, A., & Mojiri, A. 2014. Essential oil composition and antimicrobial screening of some Iranian herbal plants on *Pectobacterium carotovorum*. *Global NEST J*, 16, 240-250.
- Momol, M.T., Mitchell, D.J., Rayside, P.A, Olson, S.M. & Momol, E.A. 2000. Plant essential oils as potential bio-fumigants for the management of soilborne pathogens of tomato. (Abstr.) *Phytopathology*. 90: S127.
- Neri, F., Mari, M. & Brigati, S. 2006. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology*. 55: 100- 105.
- Odutayo, O.I., Amusa, N.A., Okutade, O.O. & Ogunsanwo, Y.R. 2007. Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*. 2: 067-072.
- Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D. & Dixit, S.N. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Z. Pflkrankh. Pfschutz*. 89: 344-349.
- Perina, F.J., Amaral, D.C., Fernandes, R.S., Labory, C.R., Teixeira, G.A., & Alves, E. 2014. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action. *Pest management science*.

Short Article

Effect of some herbal compounds on fungal and bacterial infections in micropropagation of plants

Zahra Eftekhari¹, Esmail Chamani¹, Mahmoud Bagheri Kheirabadi¹, Foroghedein Zargarzadeh², Mehdi Davari²

1. Department of Horticulture, College of Agriculture science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Department of Plant Protection, College of Agriculture science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Corresponding author: Mehdi Davari, email: mdavari@uma.ac.ir

Received: Mar., 30, 2015

4 (1) 79-84

Accepted: Aug., 08, 2016

Abstract

Fungal and bacterial infections are main problems in the micropropagation of bulbous plants which can affect the efficiency of these propagation methods. To investigate the effect of different concentrations of herbal compounds on the growth and regeneration of crown imperial, an experiment was conducted based on the completely randomized design in factorial arrangement with five replications. Treatments included various concentrations of S-carvon, thymol and carvacrol. The concentrations of thymol and carvacrol significantly ($P<0.05$) inhibited the fungal and bacterial growth. Thymol at 150 ppm and carvacrol at 100 ppm completely inhibited the growth of *Alternaria* sp. (100%). Investigation on the effects of plant extract compounds on bacterial pathogens removal revealed that 200 ppm of thymol and carvacrol completely inhibited the growth of *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovorum* with 0.1-0.2 OD (Optical density). Moreover, maximum growth inhibition of *P. carotovora* subsp. *carotovorum* with OD=2 by thymol and carvacrol was observed at the rate of 300 and 400 ppm, respectively. Various concentrations of S-carvon did not significantly affect fungal and bacterial pathogens comparing to the control. In general, carvacrol and thymol could effectively prevent the fungal and bacterial growth and could be used as a potential candidate for the prevention of fungal and bacterial infection of culture medium in the micropropagation of plants such as crown imperial.

Keywords: bulbous plants, carvacrol, tissue culture, *Alternaria* sp., *Pectobacterium carotovora*, thymol