مقاله‌ی کوتاه علمی

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

زهرا افتخاری[۱]، اسماعیل چمنی[۱]، محمود باقری خیرآبادی[۱]، فروغ الدین زرگرزاده[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 دریافت: ۹۴/۰۱/۱۰ ۴ (۱) ۷۹-۸۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۱۸

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 تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیبات گیاهی در رفع این قبیل آلودگی‌ها از محیط‌کشت گیاه پیازی لاله واژگون، سه آزمایش به‌طور جداگانه در قالب طرح کاملا 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 ppm ۱۰۰ کارواکرول و ppm ۱۵۰ تیمول بازدارندگی کامل از رشد قارچ *Alternaria* sp. را نشان داد. همچنین رشد باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* با چگالی نوری ۰/۲-۰/۱ در غلظت ppm ۲۰۰ کارواکرول و تیمول و نیز در چگالی نوری ۲ با غلظت ppm ۳۰۰ تیمول و ppm ۴۰۰ 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، *Alternaria* sp.، *Pectobacterium carotovora*

مقدمه

آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مهم‌ترین عوامل مشکل‌ساز در روش‌های مختلف کشت درون شیشه‌ای می‌باشند. از جمله این عوامل می‌توان به قارچ‌های جنس *Alternaria*، *Aspergillus*، *Penicillium* و باکتری‌های *Pectobacterium*، *Erwinia* و *Ralstonia* اشاره نمود (Odutayo *et al.*, 2007). برای جلوگیری از این نوع آلودگی‌ها برخی ترکیبات گیاهی در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرارگرفته‌اند. به‌نظر می‌رسد کاربرد ترکیبات با منشاء گیاهی و با خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی در محیط کشت درون شیشه‌ای می‌تواند میزان آلودگی را تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش دهد. بر همین اساس، در پژوهش حاضر تأثیر سه ترکیب گیاهی به‌نام اس- کاروون، تیمول و کارواکرول در رفع آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از محیط کشت ریز ازدیادی 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،

Archive of SID

www.SID.ir

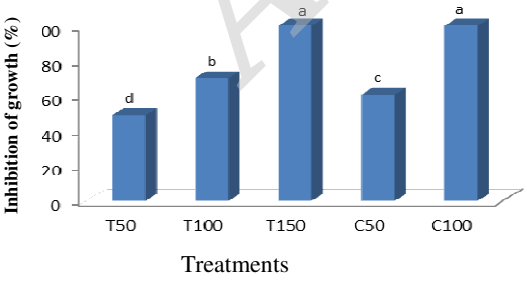
۱۵۰، ۲۰۰، ...، ppm ۱۰۰۰)، تیمول (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ppm ۳۰۰) و کارواکرول (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ppm ۴۰۰) تهیه شد. پس از استقرار ریز نمونه‌ها در محیط‌کشت، تشتک‌های پتری در اتاقک‌های رشد با دمای ۲±۲۴ سلسیوس با شدت نوری ۶۰ – ۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

به‌منظور ارزیابی اثر ضدقارچی ترکیبات گیاهی، یکی از قارچ‌های آلوده کننده متداول از محیط‌کشت MS حاوی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون جداسازی و پس از خالص‌سازی با روش تک اسپور با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مطابق کلید Barnett & Hunter (1998) به‌عنوان جنس قارچی *Alternaria* تشخیص داده شد. سپس یک دیسک قارچی به‌قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه هفت روزه به‌کمک چوب‌پنبه سوراخ‌کن سترون در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف ترکیبات گیاهی اس- کاروون، تیمول و کارواکرول مایه‌زنی شد. بعد از گذشت پنج روز، محیط‌های کشت به‌طور روزانه کنترل شده و تغییرات یاداشت شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف ترکیبات گیاهی با بهره‌گیری از فرمول ارایه شده توسط Pandey *et al.* (1982) محاسبه شد: $GI\ \% = (dc - dt/dc) \times 100$ =GI بازدارندگی از رشد، dc= میانگین قطر رشد قارچ در شاهد، dt= میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد بررسی (میلی‌متر).

به‌منظور ارزیابی اثر ضدباکتریایی ترکیبات گیاهی از جدایه استاندارد باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* به‌شماره‌ی PTCC No. 1675 که از سازمان پژوهش‌های علمی‌صنعتی ایران تهیه شده بود، استفاده شد. برای مایه‌زنی باکتری به‌محیط‌های کشت حاوی ترکیبات گیاهی، از کشت تازه باکتری، سوسپانسیون تهیه شد. رقت‌سنجی سوسپانسیون باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام گرفت. برای رقیق‌سازی سوسپانسیون به‌منظور رسیدن به‌چگالی نوری (OD: optical density or absorbance) ۰/۲، ۰/۱– ۰/۲ از آب مقطر سترون استفاده شد. از سوسپانسیون‌های آماده شده با استفاده از قطره‌چکان به‌یک اندازه (سه قطره) در محیط‌های کشت MS جامد حاوی غلظت‌های متفاوت ترکیبات گیاهی فوق و با استفاده از لوپ سترون به‌صورت مخطط مایه‌زنی شد و محیط‌های کشت به‌طور روزانه مورد بازرسی قرار گرفتند. میزان بازدارندگی سه ترکیب گیاهی از رشد قارچ و باکتری مورد آزمون با بهره‌گیری از فرمول (1982) Pandey *et al.* تعیین شد. داده‌ها با استفاده از تبدیل جذری $\sqrt{X + 0.5}$ نرمال‌سازی شده و سپس با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملا تصادفی و آزمون مقایسه‌ی میانگین دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

براساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، غلظت‌های مختلف اس- کاروون در برطرف کردن آلودگی‌های قارچی و باکتریایی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان ندادند و بنابراین از تجزیه و تحلیل نتایج حذف شدند. نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس نشان داد که اثر تیمول و کارواکرول در بازدارندگی از رشد قارچ *Alternaria* sp. در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰ و ۱۵۰ قسمت در میلیون به‌ترتیب 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= کاواکرول).

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

Archive of SID

www.SID.ir

براساس نتایج به‌دست آمده ، کارواکرول با غلظت ppm ۱۰۰-۵۰ باعث کاهش رشد ۱۰۰- ۶۰/۷۲ درصدی و تیمول با غلظت ppm ۱۵۰ -۵۰ 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 ± SE		Concentrations (ppm)
Thymol	Carvacrol	
48.97±0.94d	60.72±1.31c	50
70.07±0.44b	100±00a	100
100±00a	100±00a	150

میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

تیمول با غلظت ۲۰۰ و ۳۰۰ قسمت در میلیون (جدول ۲) به‌ترتیب در دو رقت باکتری با چگالی نوری ۰/۲-۰/۱ و ۲ و کارواکرول با غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ قسمت در میلیون (جدول ۳) به‌ترتیب در دو رقت فوق باعث بازداری 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.

Bacteria dilutions			
Pure colony	OD: 2	OD: 0.1-0.2	Thymol concentrations (ppm)
–	–	–	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.

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 شده‌است (Momol *et al.*, 2000). در مطالعات Elansary *et al.*, (2012)، اثرات ضدمیکروبی برگ سه گیاه جمبو، زربین و شاه‌پسند درختچه‌ای روی برخی باکتری‌ها از جمله *P. carotovora* مشاهده و معلوم شده است که در بین آن‌ها اثر گیاه جمبو به‌دلیل 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 به‌وجود 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 به‌میزان ۱۰۰٪ باعث جلوگیری از

Archive of SID

www.SID.ir

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

جدول ۳- قابلیت بازدارندگی غلظت‌های مختلف کارواکرول در رشد باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* در رقت‌های 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 ضدقارچی تیمول، کارواکرول، ائوگنول و منتول در کنترل رشد قارچ‌های آلوده کننده غذا ارزیابی شد و معلوم شد که ترکیبات فوق علیه این نوع قارچ‌ها مؤثرند و بیشترین کارایی به کارواکرول اختصاص داشت (Abbaszadeh *et al.*, 2014). خاصیت کارواکرول در افزایش ماندگاری لیمو به‌دلیل کاهش قارچ‌ها و میکروب‌های عامل فساد میوه نیز به اثبات رسیده است (Castillo *et al.*, 2014). نتایج پژوهش حاضر نیز استفاده از ترکیبات گیاهی را در ممانعت از آلودگی‌های قارچی و باکتریایی محیط کشت‌های ریزازدیادی گیاهی به‌صورت موفقیت‌آمیز نشان داد و به‌نظر می‌رسد این ترکیبات گیاهی به‌ویژه کارواکرول می‌تواند خاصیت ضد قارچی و ضدمیکروبی را به‌اشکال مختلف و کاربردهای متنوع نشان دهد. استفاده از ترکیبات گیاهی و مواد زیستی در مهار آفات و بیماری‌های گیاهی به‌جای مواد شیمیایی چند سالی است که در تحقیقات گیاه‌پزشکی جایگاه مناسبی پیدا کرده است، اما کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در کشت بافت و ریزازدیادی را شاید بتوان به‌عنوان عملی‌ترین موارد استفاده از این ترکیبات برشمرد. ضمناً غلظت‌های پایین تیمول و کارواکرول تأثیر مثبت بر پارامترهای رشدی از جمله تعداد پیازچه، ریشه و برگ داشت، اما در غلظت‌های بالا کاهش رشد و گیاه‌سوزی مشاهده شد (نتایج در دست انتشار). طبق نتایج این پژوهش می‌توان امیدوار بود که به‌جای استفاده از ترکیبات شیمیایی برای برطرف کردن این آلودگی‌ها از ترکیبات گیاهی طبیعی که خوشبختانه زمینه تهیه و تولید مواد اولیه آن‌ها در کشور ما فراهم است، استفاده نمود. ترکیبات گیاهی با وجود قیمت تمام شده بالاتر در مقایسه با قارچ‌کش‌ها و باکتری‌کش‌ها به‌دلیل تأثیر در غلظت بسیار پایین، توجیه اقتصادی مناسبی نیز دارند.

Archive of SID

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.

www.SID.ir

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 form 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 sauveolens. Z. Plfkrankh. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Short Article

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

Zahra Eftekhari[1], Esmaeil Chamani[1], Mahmoud Bagheri Kheirabadi[1], Foroghedein Zargarzadeh[2], Mehdi Davari[2]

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. carotovorum* 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

Archive of SID

www.SID.ir