

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های طبیعی جهت گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های توت فرنگی

مینا تقی زاده^{۱*}، موسی سلگی^۱، ایمان شهرجردی^۲

۱-استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

۲-کارشناس ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

چکیده

پاتوژن‌های درون شیشه‌ای یکی از مهمترین مشکلات در مراحل ریزازدیادی گیاهان می‌باشند، بنابراین اولین مرحله گندزدایی مواد گیاهی است. این پژوهش با هدف بهینه کردن گندزدایی ریزنمونه‌های توت‌فرنگی با استفاده از اسانس‌های مختلف (اوژنول، کارواکرول و تیمول) در قالب چهار آزمایش انجام گرفت: ۱- گندزدایی ریزنمونه با ۰/۵ درصد اسانس‌ها در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه ۲- گندزدایی ریزنمونه با ۰/۵ درصد اسانس‌ها در زمان‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه ۳- گندزدایی ریزنمونه با یک درصد اسانس‌ها در زمان‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه ۴- اسپری برگی با ۰/۵ درصد اسانس‌ها به منظور کاهش پاتوژن‌های گیاهان مادری. نتایج نشان داد تیمول بیشترین و اوژنول کمترین بازدارندگی رشد میکروبی را داشت. گندزدایی ریزنمونه با کارواکرول ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، ۸۳ درصد بازدارندگی آلودگی باکتریایی را فراهم کرد. تیمول ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در حذف آلودگی‌های قارچی در کشت درون شیشه‌ای توت‌فرنگی موثر باشد.

کلید واژه‌ها: تیمول؛ کارواکرول؛ کشت بافت؛ باکتری؛ قارچ؛

مقدمه

می‌شوند، برای میکروارگانیزم‌ها سمی بوده ولی برای بافت گیاهی غیرسمی است. از جمله این مواد می‌توان به انواع قارچ کش‌ها، هیپوکلیپریت سدیم، هیپوکلیپریت کلسیم، الکل اتیلیک، نیترات نقره، کلرید جیوه، آنتی بیوتیک‌ها یا قارچ کش‌ها و غیره اشاره کرد (Perez - tornero et al., 1999). کشت مریستم، ریز پیوندی، گرما درمانی و شیمی درمانی از جمله روش‌هایی هستند که برای حذف آلودگی‌های ویروسی در تعدادی از گونه‌های گیاهی متداول است. اما بعضی مواقع آلودگی‌های درونی، حتی با روش‌های فوق الذکر نیز حذف نمی‌شوند (Perez - tornero et al., 1999; Chorbel et al., 1998).

امروزه گزارش‌های متعددی در زمینه اثرات اسانس‌ها به عنوان ترکیبات روغنی معطر در صنایع غذایی و کشاورزی در دسترس است. خواص ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی بیشتر برای افزایش عمر پس از برداشت محصولات کشاورزی مانند میوه‌ها، سبزی‌ها و گل‌های شاخه بریده مورد استفاده قرار می‌گیرد. پژوهش‌ها در زمینه کاربرد اسانس‌ها در کشت درون شیشه‌ای گیاهان به ندرت در دسترس می‌باشد. تقی‌زاده و سلگی (Taghzadeh & Solgi, 2014) گزارش کردند که گندزدایی با اسانس‌های تیمول و کارواکرول (۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به ترتیب بر روی آلودگی‌های باکتریایی و قارچی درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های گره‌ای چمن برم‌وداگرس موثر می‌باشند و فعالیت

بافت‌های گیاهی طی مراحل مختلف کشت درون شیشه‌ای، در معرض تنش‌هایی قرار می‌گیرند که در زیستگاه طبیعی‌شان هیچگاه با آن مواجه نشوند. این تنش‌ها عکس عمل‌های قابل توجهی بر روی بیان ژنوم گیاهی دارد که می‌تواند باعث ایجاد پاسخ جدیدی در تنش‌های کشت بافتی گردد. به طور کلی تنش‌ها در کشت بافت نا مطلوب می‌باشند، اگرچه بعضی از تنش‌ها ممکن است اثرات مفیدی نیز داشته باشند. از بارزترین تنش‌ها و اختلالات بر سر راه کشت‌های درون شیشه‌ای به موارد زیر می‌توان به حضور و گسترش پاتوژن‌های درون شیشه‌ای اشاره کرد (Bairu & Kane, 2011). پاتوژن‌های درون شیشه‌ای یکی از مشکلات بسیار جدی در فرآیند ریز ازدیادی است. به عبارتی دیگر بیشتر میکروارگانیزم‌هایی که برای کشت بافت‌های درون شیشه‌ای مشکل آفرین هستند، در مزرعه و در هوای آزاد مشکل جدی ایجاد نمی‌کنند، اما زمانی که ماده گیاهی از مزرعه برداشت شده و برای کشت درون شیشه‌ای استفاده می‌شود، علیرغم استفاده از روش‌های ضد عفونی منجر به آلودگی شده و فرآیند کشت بافت را در همان مراحل اولیه متوقف می‌کنند. دلیل این موضوع مهیا بودن یک محیط غذایی غنی درون شیشه‌ای است که باعث می‌شود باکتری‌ها و قارچ‌ها به سرعت در آن رشد و نمو نمایند. در نتیجه اولین قدم در شروع کشت بافت بر طرف کردن آلودگی است (Cassells 2000; Debergh and Vanderschaeghe 1991). موادی که برای ضد عفونی و همچنین محلول‌پاشی بر علیه میکروارگانیزم‌های بیرونی استفاده

کشت اضافه گردید. به منظور تهیه محیط کشت پس از توزین ۳۰ گرم ساکارز و حل شدن در آب مقطر، از تنظیم کننده‌های رشد ذکر شده و نمک پودری MS در مقدار مورد نیاز به محیط کشت اضافه شد. حجم محلول فوق به یک لیتر رسانیده و pH محیط کشت توسط KOH و یا NaOH یک نرمال تنظیم و در نهایت نیز هفت گرم آگار برای جامد کردن محیط کشت اضافه شد. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند.

در این پژوهش از توت فرنگی رقم «Fragaria x ananassa» (Gaviota) که در شرایط گلخانه‌ای مناسب پرورش یافته بودند استفاده شد. ریزه‌گونه‌های مورد استفاده برگ‌های نسبتاً جوان بود. برگ‌ها ابتدا در زیر آب جاری به همراه یک قطره مایع ظرفشویی به مدت ۲۰ دقیقه شستشوی اولیه داده شد. ریزه‌گونه‌های در حدود ۱ در ۱ سانتی متر مربع تهیه گردید و از سطح رویی برگ بر روی محیط کشت قرار داده شد. در ریزه‌گونه‌هایی که نیاز به گندزدایی با روش‌های متداول داشت (شاهد)، عملیات گندزدایی با استفاده از سفید کننده تجاری خانگی (وایتکس گلرنگ) ۵۰ درصد (دارای ۲/۲۵ درصد ماده فعال) به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. سپس ریزه‌گونه‌های کشت شده در داخل اتاقک رشد کنترل شده با دمای ۱/۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند.

این پژوهش نیز در قالب چهار آزمایش مجزا اجرا گردید. آزمایش اول: به منظور کنترل پاتوژن‌های گیاهی در این آزمایش از غلظت پایه ۰/۵ درصد سه نوع اسانس اوژنول، کارواکرول و تیمول در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه برای گندزدایی ریزه‌گونه‌های برگ استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل نوع اسانس (با سه سطح) و زمان گندزدایی (با پنج سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. آزمایش دوم: به منظور کنترل پاتوژن‌های گیاهی در این آزمایش از غلظت پایه ۰/۵ درصد سه نوع اسانس اوژنول، کارواکرول و تیمول در زمان‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه برای گندزدایی ریزه‌گونه‌های برگ استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل نوع اسانس (با سه سطح) و زمان گندزدایی (با چهار سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

آزمایش سوم: به منظور کنترل پاتوژن‌های گیاهی در این آزمایش از غلظت پایه یک درصد سه نوع اسانس اوژنول، کارواکرول و تیمول در زمان‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه برای گندزدایی ریزه‌گونه‌های برگ استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل نوع اسانس (با سه سطح) و زمان گندزدایی (با پنج سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. آزمایش چهارم: در آزمایش اول، ابتدا پایه‌های مادری توت فرنگی در گلخانه با سه اسانس با غلظت ۰/۵ درصد اوژنول، کارواکرول و تیمول سطح رویی و پشتی برگ‌ها کاملاً محلول پاشی شدند. سپس از پایه‌های محلول پاشی شده پس از دو روز ریزه‌گونه‌های برگ گرفته شد و تحت دو تیمار بدون هیچ نوع گندزدایی (قرار دادن ریزه‌گونه‌ها ۵ دقیقه در آب مقطر استریل) و یا گندزدایی با غلظت ۰/۵ درصد اوژنول به مدت ۵ دقیقه گندزدایی، سه بار شستشو با آب مقطر استریل و سپس در محیط کشت استریل کشت شدند. به دلیل اینکه در آزمایش‌های قبلی اوژنول کمترین اثر قهوه‌ای شدن را داشت، برای گندزدایی سطحی فقط از اسانس اوژنول استفاده شد. همچنین ریزه‌گونه‌های گرفته شده از پایه‌ها بدون هیچگونه اعمال اسانس پاشی برای مقایسه سایر تیمارها با آن به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور نوع اسانس (سه سطح) و عملیات گندزدایی (دو سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد.

به طور کلی نتایج این آزمایش براساس میزان قهوه‌ای شدن ریزه‌گونه‌های کشت شده براساس علایم پدیده قهوه‌ای و سیاه شدن سطح برگ، میزان آلودگی باکتریایی ریزه‌گونه‌ها براساس وجود لکه‌های ژلاتینی به رنگ زرد، سفید، شیری و صورتی، میزان آلودگی قارچی براساس کلونی‌های میسلیوم

ضدقارچی تیمول و کارواکرول بستگی به غلظت و مدت زمان تیمارها دارد. گوران و همکاران (۱۳۹۲) از غلظت‌های ۲۵۰ الی ۱۰۰۰ پی پی ام اسانس اسطوخودوس به منظور گندزدایی ریزه‌گونه‌های برگ انگور به مدت یک و چهار ساعت استفاده نمودند و مشاهده کردند که غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام از این اسانس توانست میزان آلودگی ریزه‌گونه‌ها را به طور کامل مهار کند. دین و همکاران (Deein et al., 2013) تاثیر عصاره‌های برخی گیاهان دارویی را بر روی استریل کردن محیط کشت درون شیشه‌ای داوودی مورد بررسی قرار داد و گزارش کردند که عصاره فلفل و میخک هندی در غلظت ۱۸ میکرولیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، اسانس دارچین در غلظت ۳۶ میکرولیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، اسانس اسطوخودوس در غلظت ۱۰۸ میکرولیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت و اسانس‌های زردچوبه، لیمو و درخت چای در غلظت ۲۵۲ میکرولیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، به صورت ۱۰۰ در صد در استریل کردن محیط کشت موثر بودند.

توت فرنگی (Fragaria x ananassa) (Duch سرخیان، یکی از مهم‌ترین میوه‌ها در سرتاسر دنیا محسوب می‌شود و در آب و هوای معتدل و نیمه گرمسیری تحت کشت قرار می‌گیرد. این میوه محبوبیت زیادی به علت داشتن عطر، طعم و ارزش تغذیه‌ای دارد (Denath and Teixeira da Silva, 2007). اگرچه اغلب ازدیاد توت فرنگی از طریق ساقه‌های رونده صورت می‌گیرد، تولید برخی ارقام توت فرنگی به این روش چندان مطلوب نیست و ازدیاد توت فرنگی به این روش کشت مستعد پذیرش بسیاری از بیماری‌های قارچی می‌باشد. به منظور ازدیاد توت فرنگی می‌توان از کشت بذر استفاده کرد که تنها در ارقام فاقد ساقه رونده و یا در برنامه‌های اصلاحی از آن استفاده می‌شود. علاوه بر این، بذر توت فرنگی برای جوانه زنی به شش تا هشت هفته سرمادهی و یا تیمارهای خاص نیاز دارد (Wilson et al., 1973). همچنین روش ازدیاد غیرجنسی توت فرنگی، در عمل یک گیاه مادری تنها تعداد محدودی گیاهچه با قابلیت رشد مناسب تولید می‌کند و این روش کاملاً وابسته به فصل بوده و پتانسیل تولید را می‌کاهد (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۴). از این رو، ایجاد روش‌های سریع و پر بازده ازدیاد مانند ازدیاد درون شیشه‌ای همواره مورد توجه بوده است. کشت بافت گیاهی فناوری بسیار کاربردی برای ازدیاد گیاهان است ولی بیشتر کشاورزان امکان تاسیس آزمایشگاه کشت بافت گیاهی را به طور مستقل به دلیل هزینه زیاد تولید را ندارند. یکی از مهم‌ترین مشکلات تجهیزات گران قیمت به‌ویژه دستگاه‌هایی برای عملیات اتوکلاو و گندزدایی است. بنابراین، توسعه روش‌هایی با کاربرد مواد شیمیایی یا اسانس‌های گیاهی برای از بین بردن آلودگی‌ها، به منظور جایگزین کردن روش اتوکلاو کردن برای استقرار محیط کشت‌های عاری از پاتوژن می‌تواند بهترین پروتکل برای کشت درون شیشه‌ای گیاهان باشد. بنابراین با توجه به ارزش اقتصادی و فراهم بودن بستر اقلیمی جهت کشت گسترده‌تر این محصول در نقاط مختلف ایران و به عنوان پیش زمینه لازم جهت انتقال ژن با اهداف کمی و کیفی، این پژوهش با هدف بهینه‌سازی شرایط گند زدایی سطحی ریزه‌گونه‌های توت فرنگی در شرایط کشت درون شیشه‌ای با استفاده از مهم‌ترین مواد تشکیل دهنده عصاره‌های گیاهی یعنی اوژنول، تیمول و کارواکرول صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این طرح از محیط کشت متداول تجاری MS (شرکت سیگما) استفاده شد. تنظیم کننده‌های رشد که در این تحقیق استفاده شد شامل ایندول بوتیریک اسید (IBA) به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل آدنین (BA) دو میلی‌گرم در لیتر بود. اسانس‌های خالص مورد استفاده در این پژوهش شامل اوژنول، کارواکرول و تیمول (شرکت سیگما) بود که در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه گرم کن استیر در داخل آب مقطر براساس غلظت‌های مختلف در تیمارهای مورد استفاده در هر آزمایش حل و سپس به محیط

در همه زمانها میزان قهوه‌ای شدن ریزغونه را نسبت به شاهد افزایش داد و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن گندزدایی با اسانس تیمول در زمانهای ۶۰ الی ۱۲۰ دقیقه بود. بین زمانهای مختلف بر روی میزان قهوه‌ای شدن ریزغونه‌ها تفاوت معنی‌دار نبود. اوژنول در هیچ کدام از زمانهای گندزدایی نتوانست آلودگی باکتریایی را کنترل کند ولی کارواکرول در طی زمانهای ۹۰ الی ۱۲۰ دقیقه (۳۳ درصد) و تیمول در زمانهای ۳۰ الی ۱۲۰ دقیقه (۵۹-۵۲ درصد) گندزدایی باعث کنترل آلودگی باکتریایی ریزغونه‌های توت فرنگی نسبت به شاهد شد. اوژنول و کارواکرول در کنترل آلودگی‌های قارچی کشت‌ها در همه زمانهای گندزدایی کارایی نداشت ولی تیمول در مدت زمان گندزدایی ۳۰ الی ۹۰ دقیقه آلودگی‌های قارچی (۵۲-۳۴ درصد) را نسبت به شاهد کاهش داد (جدول ۱).

سفید و سیاه و میزان سالم بودن ریزغونه‌های کشت شده و تولید کالوس در محیط کشت‌های مختلف از روز اول پس از کشت مورد ارزیابی و یادداشت برداری قرار گرفت. داده‌ها ابتدا به درصد تبدیل شدند و پس از نرمال کردن داده‌های غیرنرمال با استفاده از روش لگاریتم با ANOVA و با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شدند. آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری بین میانگین تیمارها انجام شود.

نتایج

نتایج آزمایش اول: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دهنده اثر معنی‌دار اثرات ساده و متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی بر روی آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و میزان قهوه‌ای شدن ریزغونه بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که گندزدایی با اوژنول نیز هیچ‌گونه اثر مخربی بر مرگ و قهوه‌ای شدن ریزغونه‌ها نداشت. گندزدایی با اسانس‌های کارواکرول و تیمول

جدول ۱- اثر متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی بر روی صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی (میانگین‌هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی دار نیستند)

نوع اسانس	زمان گندزدایی (ثابت)	صفات	
		میزان قهوه‌ای شدن (%)	میزان آلودگی باکتریایی (%)
شاهد	۰	۰c	۱۰۰ a
اوژنول	۳۰	۰c	۱۰۰a
	۶۰	۰c	۱۰۰a
	۹۰	۰c	۱۰۰a
	۱۲۰	۰c	۱۰۰a
	۳۰	۸b	۱۰۰a
کارواکرول	۶۰	۸۳۲b	۱۰۰a
	۹۰	۸۳۲b	۶۶/۶۷b
	۱۲۰	۸۳۲b	۶۶/۳۲b
	۳۰	۸۳۲b	۶۶/۶۷b
	۶۰	۱۶/۶۷a	۴۱/۶۷cd
تیمول	۹۰	۱۶/۵a	۴۸c
	۱۲۰	۱۶/۶۷a	۴۸/۳۳cd
	۳۰	۱۶/۶۷a	۵۸/۱۳c

از نظر کنترل آلودگی‌های باکتریایی نبود. در مورد کنترل آلودگی‌های قارچی ریزغونه‌های توت فرنگی اثر اسانس‌ها مشابه کنترل آلودگی‌های باکتریایی بود. همچنان کاربرد اوژنول جهت گندزدایی ریزغونه‌ها تاثیری در کنترل آلودگی‌های قارچی نسبت به شاهد نداشت (۱۰۰ درصد آلودگی قارچی). ولی کارواکرول و تیمول با افزایش زمان گندزدایی، تا حد زیادی پاتوژن‌های قارچی را کنترل کردند که با شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. کمترین میزان آلودگی قارچی (۸ درصد) با گندزدایی ریزغونه‌های برگ‌ی با ۲۰ دقیقه تیمول به‌دست آمد. براساس نتایج این آزمایش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که هرچند هیچ کدام از تیمارها بطور ۱۰۰ درصد نتوانست آلودگی‌های درون شیشه‌ای را کنترل کند ولی تیمار گندزدایی سطحی ریزغونه‌های برگ‌ی توت فرنگی به مدت ۱۰ دقیقه با ۰/۵ درصد اسانس کارواکرول تا حد زیادی آلودگی‌های باکتریایی (۸۳ درصد) و قارچی (۶۰ درصد) را نسبت به شاهد کاهش دهد ضمن اینکه حداقل پدیده قهوه‌ای شدن ریزغونه‌ها (۱۰ درصد) در این تیمار مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج آزمایش دوم: نتایج جدول تجزیه واریانس تاثیر اسانس‌های مختلف برای گندزدایی ریزغونه‌ها نشان داد که هم اثرات ساده و هم اثرات متقابل نوع و زمان گندزدایی (در سطح ۰/۰۱ درصد) بر پاسخ درون شیشه‌ای توت فرنگی موثر بود. مقایسه میانگین اثر متقابل نوع اسانس در زمان گندزدایی ریزغونه نشان دهنده این بود که با افزایش زمان گندزدایی، میزان قهوه‌ای شدن ریزغونه نسبت به شاهد افزایش یافت. زمان‌های ۵ و ۱۰ دقیقه از نظر اثر بر روی میزان قهوه‌ای شدن نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی مدت زمان ۲۰ دقیقه گندزدایی ریزغونه‌های برگ‌ی توت فرنگی با اسانس‌ها به شدت قهوه‌ای شدن را افزایش داد، به گونه‌ای که گندزدایی با ۲۰ دقیقه کارواکرول در حدود ۸۰ درصد ریزغونه‌ها را از بین برد. گندزدایی ریزغونه‌ها با اسانس اوژنول بر خلاف دو اسانس دیگر در هیچ‌کدام از زمان‌ها نتوانست آلودگی باکتریایی را نسبت به شاهد کنترل کند. گندزدایی ریزغونه‌های برگ‌ی توت فرنگی با اسانس‌های تیمول و به‌ویژه کارواکرول به میزان زیادی نتوانستند آلودگی باکتریایی را نسبت به شاهد کاهش دهند. در هر تیمار بین زمان‌های مختلف گندزدایی (۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) تفاوت معنی‌داری

جدول ۲- اثر متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی بر روی صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی (میانگین‌هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار نیستند)

نوع اسانس	زمان گندزدایی (دقیقه)	صفات		
		میزان آلودگی باکتریایی (%)	میزان آلودگی قارچی (%)	میزان قهوه‌ای شدن (%)
شاهد	۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۰
اوژنول	۵	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۴/۵d
	۱۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۷/۵d
	۲۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۲۵c
	۵	۱۶/۶۷c	۵۰b	۶d
کارواکرول	۱۰	۱۶/۶۷c	۴۰bc	۱۴cd
	۲۰	۱۶/۶۷c	۳۳/۳۳bc	۸۳/۳ a
	۵	۵۰b	۵۰b	۶d
تیمول	۱۰	۵۸/۳۳b	۳۳/۳۳bc	۶/۶۶d
	۲۰	۵۸/۳۳b	۸/۳۳c	۴۵b

با کاربرد سه نوع اسانس میزان شیوع پاتوژن‌های باکتریایی در هنگام افزایش زمان گندزدایی ریزغونه‌ها از ۱۰ الی ۱۵ دقیقه نسبت به شاهد کاهش یافت، بطوریکه گندزدایی ریزغونه‌ها با ۱۵ دقیقه از هر سه اسانس به شدت آلودگی باکتریایی کاهش یافت. کمترین میزان آلودگی باکتریایی در تیمار گندزدایی با کارواکرول یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد. در مورد آلودگی‌های قارچی اسانس‌های کارواکرول و تیمول بهتر از اوژنول عمل نمودند و گندزدایی ریزغونه با این دو اسانس به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه آلودگی قارچی کشت‌ها به میزان ناچیز ۵ الی ۱۳ درصد رسید (جدول ۳).

نتایج آزمایش سوم: براساس نتایج آزمایش اول و دوم، در این آزمایش از غلظت بیشتر اسانس‌ها برای گندزدایی سطحی ریزغونه‌های توت‌فرنگی یعنی یک درصد استفاده شد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دهنده معنی‌دار بودن اکثر اثرات ساده و متقابل نوع و غلظت اسانس بر صفات قهوه‌ای شدن، میزان آلودگی باکتریایی و قارچی بود. در طی این آزمایش اسانس اوژنول با زمان گندزدایی ۵ و ۱۰ دقیقه و کارواکرول ۵ دقیقه در میزان قهوه‌ای شدن ریزغونه‌ها تاثیری نداشتند. ولی زمان‌های ۱۰ و ۱۵ دقیقه گندزدایی با یک درصد کارواکرول و تیمول باعث افزایش میزان ترشح فنل در ریزغونه‌های برگی شدند.

جدول ۳- اثر متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی ریزغونه بر روی صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی (میانگین‌هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار نیستند)

نوع اسانس	زمان گندزدایی (دقیقه)	صفات		
		میزان آلودگی باکتریایی (%)	میزان آلودگی قارچی (%)	میزان قهوه‌ای شدن (%)
شاهد	۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۰c
اوژنول	۵	۱۰۰ a	۲۶/۶۷cd	۰c
	۱۰	۷۵ab	۴۱/۶۷bc	۰c
	۱۵	۳۳/۳۳cde	۵۸/۳۳b	۱۶/۶۷c
	۵	۱۰۰ a	۱۱/۶۷d	۰c
کارواکرول	۱۰	۴۶/۶۷bcd	۶/۶۷d	۷۶/۶۶b
	۱۵	۸/۳۳e	۸/۳۳d	۱۰۰ a
	۵	۸۵a	۱۳/۳۳d	۱۱/۶۶ c
تیمول	۱۰	۲۵de	۶/۶۷d	۷۶/۶۶b
	۱۵	۲۳de	۵d	۱۰۰ a

نتوانست میزان آلودگی باکتریایی را در پایه‌های مادری کاهش دهد و با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ولی ریزه‌نونه‌هایی که از این پایه‌ها گرفته شده بودند و قبل از کشت با اوژنول گندزدایی شدند، میزان آلودگی باکتری آنها ۲۰ درصد کاهش یافت. اسانس‌پاشی با کارواکرول و تیمول میزان شیوع پاتوژن‌های باکتریایی را به میزان زیادی کاهش داد. اسانس‌پاشی با کارواکرول چه زمانی که ریزه‌نونه‌ها گندزدایی شدند و چه بودن هیچ‌گونه گندزدایی سطحی کشت شدند، آلودگی باکتری در حدود ۷۰ الی ۸۵ درصد نسبت به شاهد کاهش داد. تیمول به شدت کمتری آلودگی‌های باکتریایی را نسبت به کارواکرول کنترل نمود. ریزه‌نونه‌های حاصل از پایه‌های اسانس‌پاشی شده با تیمول در صورت گندزدایی ۴۰ درصد و عدم گندزدایی ۳۰ درصد نسبت به شاهد آلودگی‌های باکتریایی کاهش یافت. عدم گندزدایی ریزه‌نونه‌های گرفته شده از سه تیمار محلول‌پاشی با اسانس‌های اوژنول، کارواکرول و تیمول هیچ اثری در کنترل آلودگی‌های قارچی نداشت ولی زمانی که همین ریزه‌نونه‌ها با اوژنول ابتدا گندزدایی سطحی و سپس کشت شدند، ریزه‌نونه‌های گرفته شده از پایه‌های محلول‌پاشی با اوژنول، کارواکرول و تیمول به ترتیب شیوع قارچ ۸۴، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته بود (جدول ۴).

نتایج آزمایش چهارم: نتایج تجزیه واریانس اثر اسانس‌پاشی پایه‌های مادری و گرفت ریزه‌نونه از آنها نشان دهنده اثر معنی‌داری بر روی اکثر صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی بود. اثرات ساده نوع اسانس محلول‌پاشی شده بر روی میزان قهوه‌ای شدن ریزه‌نونه‌ها و میزان آلودگی باکتریایی، اثرات ساده شرایط گندزدایی بر کلیه صفات و اثرات متقابل نوع اسانس محلول‌پاشی شده در شرایط گندزدایی بر صفات میزان قهوه‌ای شدن و آلودگی قارچی همگی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین نشان داد که محلول‌پاشی با اسانس‌ها بر روی گیاه مادری اثرات نامطلوبی نداشت و حتی در تیمارهایی که اسانس‌پاشی شده بود به‌ویژه تیمول وضعیت ظاهری از نظر شادابی و رشد گیاهان نسبت به شاهد بهتر بود. زمانی که ریزه‌نونه‌های گرفته شده از پایه‌های مادری اسانس‌پاشی شده با کارواکرول و تیمول، قبل از کشت توسط اوژنول ۰/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه گندزدایی شدند میزان قهوه‌ای شدن ریزه‌نونه به شدت زیاد شد بگونه‌ای که در کارواکرول، ۱۰۰ درصد و در تیمول ۴۰ درصد کشت‌ها از بین رفتند. اسانس‌پاشی پایه‌های مادری با اوژنولو سپس کشت آنها (با گندزدایی و بدون گندزدایی) هیچ‌گونه عوارض نامطلوبی بر روی ریزه‌نونه‌ها نداشت. محلول‌پاشی گیاهان با اوژنول

جدول ۴- اثر متقابل اسانس‌پاشی پایه‌های توت‌فرنگی و گندزدایی بر صفات درون شیشه‌ای کشت توت‌فرنگی (میانگین‌هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری یا استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار نیستند)

صفات	نوع ترکیب اسانس‌های محلول‌پاشی		نوع گندزدایی
	میزان آلودگی باکتریایی (%)	میزان آلودگی قارچی (%)	
شاهد	۱۰۰a	۱۰۰a	-
اوژنول	۹۰ab	۱۰۰a	بدون گندزدایی
کارواکرول	۸۰b	۱۶/۶۶b	با گندزدایی
تیمول	۳۰d	۱۰۰a	بدون گندزدایی
	۱۵d	۰c	با گندزدایی
	۷۰bc	۱۰۰a	بدون گندزدایی
	۶۰c	۰c	با گندزدایی

گرد (گوران و همکاران، ۱۳۹۲). باکتری‌ها و قارچ‌ها از مهمترین پاتوژن‌های مشکل‌ساز در کشت‌های درون شیشه‌ای هستند. بطورکلی یک ماده ضدعفونی کننده ایده آل باید در غلظت‌های پایین و به فرم‌های مواد طبیعی برعلیه دامنه زیادی از میکروب‌ها موثر باشد. عوامل بسیاری بر کارایی ضدعفونی کننده‌های شیمیایی و گندزداها تاثیر می‌گذارند. عواملی که باید در نظر گرفته شود شامل انواع میکروارگانیسم‌های موجود، غلظت و ماهیت مواد ضدعفونی کننده و مدت زمان تیمار می‌باشد. امروزه مقاومت باکتری‌ها و قارچ‌ها به قارچ‌کش‌ها و باکتری‌کش‌های معمول عامل محدود کننده در استریل کردن مواد گیاهی و محیط کشت است. اغلب مواد شیمیایی ضد میکروبی سمیت زیادی برای موجودات دارند و امروزه علاقه زیادی به استفاده از مواد جدیدی که ایمن و موثر باشند، وجود دارد (Torres, 1989; Kumar, 2001). نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس‌ها توانستند رشد انواع آلودگی‌ها را در برخی از تیمارها مهار کنند. مطالعات نشان داده است که اسانس‌های استخراج شده گیاهی نظیر کارواکرول، تیمول، اوژنول، لیمونین‌بورنتول ممکن است جایگزینی مناسب برای از بین بردن میکروب‌های مقاوم باشند. همچنین اینها یک سری مواد طبیعی هستند که علاوه بر این برای سلامتی بشر، سازگار با طبیعت نیز می‌باشند. فعالیت ضدقارچی فلفل

بحث
پیشگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت‌های گیاهی برای موفقیت کار از عوامل حیاتی محسوب می‌شود. آلودگی ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها از مهم‌ترین عوامل از بین رفتن گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها با گیاهان کشت شده بر سر تغذیه رقابت می‌کنند و با افزایش تراکم و تولید ترکیبات سمی، سبب افزایش مرگ و میر، نوسان در رشد، نکرروز بافت، کاهش شاخه‌زایی و ریشه دهیو به طور کلی سبب کاهش بازده تولید و حتی بازدارندگی کامل، از کشت می‌گردند. ضدعفونی سطحی یکی از مراحل بسیار مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بر روی ریزه‌نونه‌ها، در طی انجام روش‌های کشت بافت است، به همین علت بهبود روش‌ها و تحقیق در مورد مواد جدید ضدعفونی در کشت‌های درون‌شیشه‌ای از اهمیت قابل ملاحظه برخوردار است. موفقیت‌های پروتکل‌های کشت بافت گیاهی وابسته به ضدعفونی ریزه‌نونه است. در طی انجام ضدعفونی، مواد زنده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست بدهند و تنها باید آلودگی حذف گردد، بنابراین باید غلظت مواد ضدعفونی کننده و مدت زمان ضدعفونی به طور متعادل با توجه به نوع ریزه‌نونه و عدم سمیت برای آن تعیین

مانند دارچین، اسطوخودوس، لیمو و غیره را برای ضدعفونی محیط کشت به منظور جایگزینی اتوکلاو کردن محیط کشت معرفی کردند که با نتایج ما مبنی مهار کامل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی محیط کشت مشابهت دارد. یکی از موانع کاربرد اسانس‌ها به منظور گندزدایی محیط کشت و ریزه‌گونه‌ها، صدمات شدید بر روی بافت برگ‌ی توت‌فرنگی و آزاد شدن فنل و در نهایت مرگ ریزه‌گونه‌ها در طی این آزمایش بود که این اتفاق را می‌توان به طبیعت روغنی اسانس نسبت داد. توت‌فرنگی نیز مانند سایر جنس‌های خانواده رزاسه دارای ترکیبات فنلی زیادی است و در اثر تنش‌های زنده و غیرزنده مقدار آنها افزایش می‌یابد. در حین جداسازی ریزه‌گونه و پس از صدمه دیدن بافت، این ترکیبات با فعالیت پلی فنل اکسیدازها که در پلاست‌های سلول‌ها وجود دارند، اکسید شده و موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت مزبور می‌گردند. محصولات این اکسیداسیون فعالیت آنزیمی را متوقف نموده و سبب تیره شدن بافت‌ها، عدم تثبیت ریزه‌گونه در محیط کشت و در نهایت مرگ ریزه‌گونه می‌شود (Husain et al., 2007). بطور مشابهی گوران و همکاران (۱۳۹۲) اثرات سوختگی ریزه‌گونه‌های انگور را به دلیل وجود غلظت‌های زیاد اسانس‌ها در محیط کشت بر خلاف قدرت بالای اسانس‌ها در کنترل عوامل آلوده کننده گزارش کردند. بنابراین حساسیت شدید سیستم‌های گیاهی و بافت‌های علفی گیاه، ممکن است مانع استفاده از آنها در پروتکل‌های ضدعفونی باشد، ولی با توجه به سرشت روغنی اسانس‌ها این احتمال می‌رود که بتوان از آنها در غلظت‌های پایین به عنوان عامل فعال سطحی برای کاهش کثرت سطحی به جای مواد شیمیایی چونتوین استفاده نمود که باید مورد بررسی قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان دهنده آن است که حضور اسانس در محیط کشت کارآیی لازم در کنترل انواع آلودگی‌های قابل رشد در شرایط درون شیشه‌ای را دارد. افزایش کنترل رشد پاتوژن‌های درون شیشه‌ای با میزان قهوه‌ای شدن ریزه‌گونه‌های برگ‌ی توت‌فرنگی رابطه عکس داشت. در کل در بین سه اسانس مورد استفاده تیمول کارآیی بیشتری در کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای به‌ویژه قارچ‌ها با حداقل صدمه به بافت‌های گیاهی را داشت و اوژنول کمترین بازدارنده رشد و گسترش میکروارگانیسم‌ها در شرایط درون شیشه‌ای بود. گندزدایی سطحی ریزه‌گونه‌ها با کارواکرول ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه توانست تا ۸۳ درصد بازدارنده رشد باکتری‌ها با حداقل آسیب به بافت‌ها را فراهم کند. تیمول ۰/۵ درصد هم به مدت ۱۰ دقیقه می‌تواند به عنوان یک ماده گندزدای کارآمد برای کنترل قارچ‌ها (۹۱ درصد بازدارندگی) در کشت درون شیشه‌ای توت‌فرنگی توصیه شود.

سیاه علیه قارچ‌های *Fusarium* و *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus* و *verticillioidea* از گزارش شده است (Srichana et al., 2009). فعالیت آنتی‌باکتریایی اسانس‌هایی مانند فلفل سیاه (Hoque et al., 2011)، زنجبیل (Kamazeri et al., 2012)، میخک هندی (Joshi et al., 2011)، اسطوخودوس (Hui et al., 2010)، لیمو، ترنج (Kirbaslar et al., 2009)، و زردچوبه (Allawi et al., 2009) علیه برخی پاتوژن‌های غذایی گرام مثبت و گرام منفی نیز از گزارش شده است. در بررسی‌های متعددی گزارش شده که اوژنول، تیمول و کارواکرول بعنوان بیشترین اسانس‌های آویشن دارای اثرات آنتی میکروبی و آنتی اکسیدان‌تی قوی هستند. تیمول و کارواکرول به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و گروه هیدروکسیل بر روی دیواره سلول‌های میکروبی و اجزای سازنده آنها عمل می‌کنند. ویژگی مهم کارواکرول و تیمول آبرگریزی است که آنها را قادر می‌سازد در چربی‌های غشاء دیواره و میتوکندری سلول‌های باکتری نفوذ کرده، به پروتئین‌های غشاء متصل شده، لیپوپلی ساکاریدها را آزاد کرده، و در نهایت باعث اختلال در ساختمان و نفوذپذیری آنها گردد. در مرحله آخر، از دست رفتن محتویات سلول و خروج مولکول‌ها و یون‌های حیاتی منجر به مرگ میکروبی می‌شود. نوع اسانس، غلظت و زمان در معرض قرار گرفتن ریزه‌گونه‌ها همگی در میزان ضد میکروبی آلودگی‌های باکتریایی و قارچی موثر بود. نوبلوچ و همکاران (Knobloch et al., 1989) که تفاوت در میزان قارچ‌کشی اسانس‌ها به نظر می‌رسد بستگی به میزان حلالیت در آب و خواص چربی‌دوستی آنها است. فعالیت قارچ‌کشی اسانس‌ها با غلظت آنها رابطه زیادی دارد. کارواکرول دارای ساختار فنلی است که فعالیت ضد میکروبی آن بر روی باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمر ثابت شده است (Botelho et al., 2008; Yahyazadeh et al., 2007; Martinez-Romero et al., 2007; al., 2007). تیمول نیز یکی از مواد باکتری کش و قارچ کش است که بطور موثری بر روی بیماری‌های گیاهی کاربرد دارد (Braga et al., 2008; Yahyazadeh et al., 2008; Olasupo et al., 2007; Svircev et al., 2007).

تاکنون گزارش‌های بسیار کمی در مورد کاربرد اسانس‌ها برای ضدعفونی ریزه‌گونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای در دسترس است. کاربردهای مختلف اسانس‌ها به منظور گندزدایی ریزه‌گونه و یا گندزدایی محیط کشت بیشتر در کنترل آلودگی‌های قارچی موثر بود تا آلودگی‌های باکتریایی. مشابه نتایج این تحقیق تقی‌زاده و سلگی (۲۰۱۵) نیز زمانی که از تیمول و کارواکرول برای گندزدایی ریزه‌گونه‌های گره‌ای برموداگرس استفاده کردند دریافتند که آلودگی‌های قارچی توسط این اسانس‌ها کنترل شد تا آلودگی‌های باکتریایی. همچنین دین و همکاران (۲۰۱۳) اثرات اسانس‌ها را به عنوان مواد ضدعفونی کننده بر روی شرایط استریل محیط کشت MS و رشد گره‌های داوودی بر روی محیط‌های تیمار شده گزارش کردند. آنها تکنیک جایگزینی عصاره‌هایی

genia caryophyllata (clove), *Achyranthes bidentata* (datiwan) and *Azadirachta indica* (neem). *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(1): 1-7

Kamazeri, T.S.A.T., Samah, O. A., Taher, M., Susanti, D. and Qaralleh, H. (2012). Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga* and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5 (3): 202-209

Kirbaslar, F. G., Tavman, A., Dulger, B. and Turker, G. (2009). Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. *Pakistan Journal of Botany*. 41: 3207-3212

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H. and Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oil Res.*, 1:119-128

Kumar, U. (ed.). (2001). *Methods in Plant Tissue Culture*. Second Revised and enlarged edition. Agrobios, Jodhpur, India

Martinez Romero, D., Guillen, F., Valverde, J.M., Bailen, G., Zapata, P., Serrano, M., Castillo, S. and Valero, D. (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculation in table grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 144-148

Olasupo, N.A., Fitzgerald, D.J., Gasson, M.J. and Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella entericaserovar Typhimurium*. *Lett. in Appl. Microbiol.* 36: 448-451

Perez tornero, O., Burgos, L. and Egea, J. (1999). Introduction and establishment of apricot *In vitro* through regeneration of shoots from meristem tips. *In Vitro cellular and Developmental Biology- Plant*. 35: 249 - 253

Srichana, D., Phumruang, A., A. and Chongkid, B. (2009). Inhibition effect of betel leaf extract on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Thammasat International Journal of Science and Technology*. 14(3) 74-77

Taghizadeh, M. and Solgi, M. (2014). The Application of Essential Oils and Silver Nanoparticles for Sterilization of Bermudagrass Explants *in vitro* Culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 1(2): 131-140

Torres, K.C. (ed.) (1989). *Tissue culture Techniques for Horticultural Crop*. Van No strand Reinhold. New York, 285 pp

Wilson, D., Goodall, A. and Reeves, J. (1973). An improved technique for the germination of strawberry seeds. *Euphytica* .12: 362-366

Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R. and Taheri, H. (2008). Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1445-1450

منابع

Allawi, S.S., Auda, J. M., Hameed, H. Q. and Ali, T. I. (2009). The effect of *Curcuma longa* (turmeric) rhizomes extracts on pathogenic bacteria in comparison with standard antibiotics." *Journal of Biotechnology Research Center*. 3: 15-20

Bairu, M.W. and Kane, M.E. (2011). Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. *Plant Growth Reg.* 63: 101-103

Behnamiyani, M. and Masiha, S. Strawberry. Sotoudeh publication, Tabriz, Iran

Cassells, A.C. (2000). Aseptic microhydroponics: a strategy to advance microplant development and improve microplant physiology. *Acta Hort.* 530: 187-194

Debergh, P.C. and Vanderschaeghe, A.M. (1988). Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue culture. *Acta Hort.* 255:77-81

Debnath, S.C. and Teixeira da Silva J. A. (2007). Strawberry Culture *In Vitro*: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. 1(1), 1-12

Deein, W. and Thepsithar, C. and Thongpukdee, A. (2013). *In vitro* Culture Medium Sterilization by Chemicals and Essential Oils without Autoclaving and Growth of *Chrysanthemum* Nodes. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 7: 06-24

Gouran, A., Mozafari A. and Ghaderi, N. (1392). The effect of antimicrobial agents on the surface sterilized grape explants *in vitro* culture *Vitis vinifera* L. 6th congress of the Agricultural Research findings. Kordestan university, 25, 26 Ordibehesht

Hoque, M.M., Rattila, S., Shishir, M.A., Bari, M.L., Inatsu, Y. and Kawamoto, S. (2011). Antibacterial activity of ethanol extract of betel leaf (*Piper betle* L.) against some food borne pathogens. *Bangladesh Journal of Microbiology*. 28 (1) 58-63

Hui, L., He, L., Huan, L., Xiaolan, L. and Aiguo, Z. (2010). Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis related bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 4: 309-313

Husain, M.K., Anis, M. and Shahzad, A. (2007). *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 43: 59-64

Joshi, B.G.P., Sah, B.B., Basnet Bhatt, M.R., Sharma, D., Subedi, K., Pandey, J. and Malla, R. (2011). Phytochemical extraction and antimicrobial properties of different medicinal plants: *Ocimum sanctum*. (tulsi). *Eu-*

Abstract

In vitro Pathogens are one of the serious problems in plant micropropagation process, therefore the first step is disinfection of plant material. This research with purpose of optimize disinfection explants of strawberry with usage of different essential oils (Eugenol, Thymol and Carvacrol) was performed in four experiments: 1- explants disinfecting by %0.5 essential oils at 0, 30, 60, 90 and 120 sec. 2- disinfecting explants by %0.5 essential oils at 0, 5, 10 and 20 min. 3- disinfecting explants by %1 three essential oils at 0, 5, 10 and 20 min. 4- foliar spray %0.5 essential oils to control stock plant of pathogens. The results showed that thymol had the highest and eugenol the lowest inhibition of microbial growth. The explant sterilized with %0.5 of carvacrol for 10 minutes could provide 83% inhibition bacteria contamination. The %0.5 Thymol for 10 minutes could be effective as fungi elimination (91% inhibition) for strawberry in vitro culture

Keywords: bacteria; carvacrol; fungi; thymol; tissue culture;