زیست فناوری گیاهان دارویی
سال دوم، شماره سوم، بهار و تابستان ۱۳۹۵

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

مینا تقی زاده[۱*]، موسی سلگی[۲]و ایمان شهرجردی[۳]

چکیده

رشد پاتوژن‌های درون شیشه‌ای یکی از مهمترین مشکلات در مراحل ریزازدیادی گیاهان می‌باشند، بنابراین اولین مرحله از کشت بافت 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 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. همچنین تیمول ۰/۵ درصد به مدت ۱۰دقیقه در حذف آلودگی‌های قارچی در کشت درون شیشه‌ای نتایج موثری داشت.

واژه های کلیدی: کشت بافت، تیمول، کارواکرول ، پاتوژن

۱*- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، m_taghizadeh@araku.ac.ir
۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک
۳- کارشناس ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

مقدمه

بافت‌های گیاهی طی مراحل مختلف کشت درون شیشه‌ای، در معرض تنش هایی قرارمی‌گیرندکه در زیستگاه طبیعی هیچگاه با آن مواجه نبوده‌اند. این تنش ها عکس العمل های قابل توجهی بر روی بیان ژنوم گیاهی دارد که می تواند باعث ایجاد پاسخ جدیدی در تنش های کشت بافتی گردد. به طورکلی تنش ها در کشت بافت نامطلوب می باشند، اگرچه بعضی ازتنش ها ممکن است اثرات مفیدی نیز داشته باشند. از بارزترین تنش ها و اختلالات بر سر راه کشت های درون شیشه ای می توان به حضور و گسترش پاتوژن‌های درون شیشه‌ای اشاره کرد (Bairu & Kane, 2011). پاتوژن-های درون شیشه ای یکی از مشکلات بسیار جدی درفرآیند ریز ازدیادی هستند. به عبارتی دیگر بیشتر میکروارگانیسم‌هایی که برای کشت بافت‌های درون شیشه‌ای مشکل آفرین هستند، درمزرعه و درهوای آزاد مشکل جدی ایجاد نمی کنند، اما زمانی که ماده گیاهی از مزرعه برداشت شده و برای کشت درون شیشه ای استفاده میشود، علیرغم استفاده ازروش های ضدعفونی 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 می شود باکتری ها و قارچ ها به سرعت در آن رشد و نمو نمایند. درنتیجه اولین قدم در شروع کشت بافت برطرف کردن آلودگی است (Cassells 2000; Debergh and Vanderschaeghe ,1991). موادی که برای ضد عفونی و همچنین محلول‌پاشی بر علیه میکروارگانیسم‌های بیرونی استفاده می‌شوند، برای میکروارگانیسم‌ها سمی بوده ولی برای بافت گیاهی غیرسمی است. ازجمله این مواد می‌توان به انواع قارچ‌کش‌ها، هیپوکلیریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم، الکل اتیلیک، نیترات نقره، کلرید جیوه، آنتی بیوتیک‌ها یا قارچ کش ها و غیره اشاره کرد. (Perez – tornero et al., 1999). کشت مریستم، ریز پیوندی، گرما درمانی و شیمی درمانی ازجمله روش هایی هستندکه برای حذف آلودگی های ویروسی در تعدادی از گونه های گیاهی متداول است. اما بعضی مواقع آلودگی های درونی، حتی با روش های فوق الذکر نیز حذف نمی‌شوند (Perez – tornero et al., 1999; Chorbel et al., 1998).

امروزه گزارش های متعددی در زمینه اثرات اسانس ها به عنوان ترکیبات روغنی معطر درصنایع غذایی و کشاورزی در دسترس است. خواص ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی بیشتر برای افزایش عمر پس از برداشت محصولات کشاورزی مانند میوه ها، 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 (Taghizadeh & Solgi, 2014) گزارش کردندکه گندزدایی با اسانس‌های تیمول وکارواکرول (۱۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم درلیتر) به ترتیب برروی آلودگی های باکتریایی و قارچی درون شیشه‌ای ریزنمونه های گره ای چمن برموداگرس موثر می‌باشند و فعالیت 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 منظورگندزدایی ریز نمونه‌های برگی انگور به مدت یک و چهار ساعت استفاده نمودند و مشاهده کردند که غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام از این اسانس توانست میزان آلودگی ریز نمونه‌ها را به طورکامل مهارکند.

دین و همکاران (Deein et al., 2013) تاثیر عصاره های برخی گیاهان دارویی را برروی استریل کردن محیط کشت درون شیشه ای داوودی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردندکه عصاره فلفل و میخک هندی درغلظت ۱۸ میکرولیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، اسانس دارچین درغلظت ۳۶ میکرولیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، اسانس اسطوخودوس در غلظت ۱۰۸ میکرو لیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت واسانس‌های زردچوبه، لیمو و درخت چای در غلظت ۲۵۲ میکر و

لیتر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت، به صورت ۱۰۰ در صد دراستریل کردن محیط کشت موثر بودند.

توت فرنگی *Fragaria × ananassa* (Duch) گیاهی متعلق به خانواده گلسرخیان، یکی از مهم ترین میوه ها 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 (Debnath and Teixeira da Silva, 2007). اگرچه اغلب ازدیاد توت فرنگی از طریق ساقه های 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 ازبیماری های قارچی می باشد. به منظور ازدیاد توت فرنگی می‌توان ازکشت بذر استفاده کردکه تنها درارقام فاقد ساقه رونده و یا در برنامه های اصلاحی از آن استفاده می شود. علاوه براین، بذرتوت فرنگی برای جوانه‌زنی به شش تا هشت هفته سرمادهی و یا تیمارهای خاص نیازدارد (Wilson et al., 1973). همچنین روش ازدیاد غیرجنسی توت فرنگی، درعمل یک گیاه مادری تنها تعداد محدودی گیاهچه با قابلیت رشد مناسب تولید می کند و این روش کاملاً وابسته به فصل بوده و پتانسیل تولید را می‌کاهد (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۴). ازاین رو، ایجاد روش های سریع و پربازده ازدیاد مانند ازدیاد درون شیشه‌ای همواره مورد توجه بوده است. کشت بافت گیاهی فناوری بسیار کاربردی برای ازدیادگیاهان است ولی بیشتر کشاورزان امکان تاسیس آزمایشگاه کشت بافت گیاهی را به طور مستقل به دلیل هزینه زیاد تولید ندارند. یکی از مهم ترین مشکلات تجهیزات گران قیمت به ویژه دستگاه-هایی برای عملیات اتوکلاو وگندزدایی است. بنابراین، توسعه روش‌هایی با کاربرد مواد شیمیایی یا اسانس‌های گیاهی برای ازبین بردن آلودگی ها ، به منظورجایگزین کردن روش اتوکلاوکردن 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 وکیفی، این پژوهش باهدف بهینه سازی شرایط گند زدایی سطحی ریزنمونه های توت فرنگی درشرایط کشت درون شیشه ای با استفاده از مهم ترین مواد تشکیل دهنده عصاره‌های گیاهی یعنی اوژنول، تیمول و کارواکرول صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این طرح از محیط کشت متداول و تجاری MS[۱] (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 استیرر در داخل آب مقطر بر اساس غلظت‌های مختلف در تیمارهای مورد استفاده در هر آزمایش حل و سپس به محیط کشت اضافه گردید. به منظور تهیه محیط کشت پس از توزین ۳۰ گرم ساکارز و حل شدن در آب مقطر، از تنظیم کننده های 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 یاNaOH یک نرمال تنظیم و در نهایت نیز هفت گرم آگار برای جامد کردن محیط‌کشت اضافه شد. محیط-های 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. ریزنمونه‌های مورد استفاده برگ‌های نسبتا جوان بود. برگ‌ها ابتدا در زیر

[۱] . Murashige and skoog

آب جاری به‌همراه یک قطره مایع ظرفشویی به مدت ۲۰ دقیقه شستشوی اولیه داده شد. ریزنمونه‌ها در حدود ۱ در ۱ سانتی متر مربع تهیه گردید و از سطح رویی برگ[1] بر روی محیط کشت قرار داده شد. در ریزنمونه-هایی 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 ریزنمونه های کشت شده در داخل اتاقک رشد کنترل شده با دمای ۰/۱±۲۳ درجه سانتیگراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند.

این پژوهش در قالب چهار آزمایش مجزا اجرا گردید.

آزمایش اول: به‌منظور کنترل پاتوژن‌های گیاهی در این آزمایش از غلظت پایه ۰/۵ درصد سه نوع اسانس اوژنول، کارواکرول و تیمول در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰و ۱۲۰ ثانیه برای گندزدایی ریزنمونه‌های برگی استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل نوع اسانس (با سه سطح) و زمان گندزدایی (با پنج سطح) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

آزمایش دوم: به‌منظور 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 ریزنمونه‌های برگی استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل نوع اسانس (با سه سطح) و زمان گندزدایی (با چهار سطح) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

آزمایش سوم: در این آزمایش از غلظت پایه یک درصد سه نوع اسانس اوژنول، کارواکرول و تیمول در زمان‌های صفر، ۵، ۱۰و ۱۵ دقیقه برای گندزدایی ریزنمونه‌های برگی استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل نوع اسانس (با سه سطح) و زمان گندزدایی (با پنج سطح) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

آزمایش چهارم: ابتدا پایه‌های مادری توت فرنگی در گلخانه با سه اسانس با غلظت ۰/۵ درصد اوژنول، کارواکرول و تیمول سطح رویی و پشتی برگ‌ها کاملا محلول‌پاشی شدند. سپس از پایه‌های محلول پاشی شده پس از دو روز ریزنمونه‌های برگی گرفته شد و تحت دو تیمار بدون هیچ نوع گندزدایی (قرار دادن ریزنمونه‌ها 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 ریزنمونه‌های گرفته شده از پایه‌ها بدون هیچگونه اعمال اسانس‌پاشی 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 کاملا تصادفی اجرا شد.

به طور کلی نتایج این آزمایش بر اساس میزان قهوه-ای شدن ریز نمونه‌های کشت شده بر اساس علایم پدیده قهوه‌ای و سیاه شدن سطح برگ، میزان آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌ها بر اساس وجود لکه‌های ژلاتینی به رنگ زرد، سفید، شیری و صورتی، میزان آلودگی قارچی بر اساس کلونی‌های میسیلیوم سفید و سیاه و میزان سالم بودن ریزنمونه‌های کشت شده و تولید کالوس در محیط کشت‌های مختلف از روز اول پس از کشت مورد ارزیابی و یادداشت برداری قرار گرفت. داده ها ابتدا به درصد تبدیل شدند و پس از نرمال کردن داده های غیرنرمال با استفاده از روش لگاریتم با ANOVA و با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شدند. آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین معنی دار بودن تفاوت آماری بین میانگین تیمارها انجام شود.

---

[1] Adaxial .

نتایج

نتایج آزمایش اول: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دهنده اثر معنی دار اثرات ساده و متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی بر روی آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که گندزدایی با اوژنول نیز هیچ‌گونه اثر مخربی بر مرگ و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نداشت. گندزدایی با اسانس‌های کارواکرول و تیمول در همه زمان‌ها میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه را نسبت به شاهد افزایش داد و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن گندزدایی با اسانس تیمول در زمان‌های ۶۰ الی ۱۲۰ ثانیه بود. بین زمان‌های مختلف بر روی میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها تفاوت معنی دار نبود. اوژنول در هیچ‌کدام از زمان‌های گندزدایی نتوانست آلودگی باکتریایی را کنترل کند ولی کارواکرول در طی زمان‌های ۹۰ الی ۱۲۰ ثانیه (۳۳ درصد) و تیمول در زمان‌های ۳۰ الی ۱۲۰ ثانیه (۵۹-۵۲ درصد) گندزدایی باعث کنترل آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌های توت فرنگی نسبت به شاهد شد. اوژنول و کارواکرول در کنترل آلودگی‌های قارچی کشت‌ها در همه زمان‌های گندزدایی کارآیی نداشت ولی تیمول در مدت زمان گندزدایی ۳۰ الی ۹۰ ثانیه آلودگی‌های قارچی (۳۴-۵۲ درصد) را نسبت به شاهد کاهش داد (جدول ۱).

جدول ۱- اثر متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی بر روی صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی

نوع اسانس	زمان گندزدایی (ثانیه)	صفات		
		میزان قهوه‌ای شدن (٪)	میزان آلودگی باکتریایی (٪)	میزان آلودگی قارچی (٪)
شاهد	۰	۰c	۱۰۰ a	۱۰۰ a
اوژنول	۳۰	۰c	۱۰۰a	۱۰۰a
	۶۰	۰c	۱۰۰a	۱۰۰a
	۹۰	۰c	۱۰۰a	۱۰۰a
	۱۲۰	۰c	۱۰۰a	۱۰۰a
کارواکرول	۳۰	۸b	۱۰۰a	۱۰۰a
	۶۰	۸/۳۳b	۱۰۰a	۱۰۰a
	۹۰	۸/۳۳b	۶۶/۶۷b	۹۰ab
	۱۲۰	۸/۳۳b	۶۶/۳۳b	۹۱/۶۷ab
تیمول	۳۰	۸/۳۳b	۶۶/۶۷b	۶۶/۶۷bc
	۶۰	۱۶/۶۷a	۴۱/۶۷cd	۵۸/۱۳c
	۹۰	۱۶/۵a	۴۸c	۵۱c
	۱۲۰	۱۶/۶۷a	۴۸/۳۳c	۴۸/۳۳cd

(میانگین هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی دار نیستند.)

نتایج آزمایش دوم:

نتایج جدول تجزیه واریانس تاثیر اسانس‌های مختلف برای گندزدایی ریزنمونه‌ها 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 ریزنمونه نشان دهنده این بود که با افزایش زمان گندزدایی، میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه 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 ریزنمونه‌های برگی توت فرنگی با اسانس‌ها به شدت قهوه‌ای شدن را افزایش داد، به‌گونه‌ای که گندزدایی با ۲۰ دقیقه کارواکرول در حدود ۸۰ درصد ریزنمونه‌ها را از بین برد. گندزدایی ریزنمونه‌ها با اسانس اوژنول برخلاف دو اسانس دیگر در هیچ‌کدام از زمان‌ها نتوانست آلودگی باکتریایی را نسبت به شاهد کنترل کند. گندزدایی ریزنمونه‌های برگی توت فرنگی با اسانس‌های تیمول و به‌ویژه کارواکرول به میزان زیادی توانستند آلودگی باکتریایی را نسبت به شاهد کاهش دهند. در هر تیمار بین زمان‌های مختلف گندزدایی (۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) تفاوت معنی‌داری از نظر کنترل آلودگی‌های باکتریایی نبود. در مورد کنترل آلودگی‌های قارچی ریزنمونه‌های توت فرنگی اثر اسانس‌ها مشابه کنترل آلودگی‌های باکتریایی بود. همچنان کاربرد اوژنول جهت گندزدایی ریزنمونه‌ها 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 معنی داری داشتند. کمترین میزان آلودگی قارچی (۸ درصد) با گندزدایی ریزنمونه-های برگی با ۲۰ دقیقه تیمول به‌دست آمد. بر اساس نتایج این آزمایش می‌توان نتیجه گیری کرد که هرچند هیچ کدام از تیمارها بطور ۱۰۰ درصد نتوانست آلودگی-های درون شیشه‌ای را کنترل کند ولی تیمار گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های 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 ریزنمونه‌ها (۱۰ درصد) در این تیمار مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲- اثر متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی بر روی صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی

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

(میانگین هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی دار نیستند.)

نتایج آزمایش سوم:

بر اساس نتایج آزمایش اول و دوم، در این آزمایش از غلظت بیشتر اسانس‌ها برای گندزدایی سطحی ریز نمونه‌های توت‌فرنگی یعنی یک درصد استفاده شد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دهنده معنی دار 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 ریزنمونه‌ها تاثیری نداشتند. ولی زمان‌های ۱۰ و ۱۵ دقیقه گندزدایی با یک درصد کارواکرول و تیمول باعث افزایش میزان ترشح فنل در ریزنمونه‌های برگی شدند. با کاربرد سه نوع اسانس میزان شیوع پاتوژن‌های باکتریایی در هنگام افزایش زمان گندزدایی ریز نمونه‌ها از ۱۰ الی ۱۵ دقیقه نسبت به شاهد کاهش یافت، بطوریکه گندزدایی ریزنمونه‌ها 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 به‌دست آمد. در مورد آلودگی‌های قارچی اسانس‌های کارواکرول و تیمول بهتر از اوژنول عمل نمودند و گندزدایی ریزنمونه با این دو اسانس به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه آلودگی قارچی کشت‌ها به میزان ناچیز ۵ الی ۱۳ درصد رسید (جدول ۳).

جدول ۳- اثر متقابل نوع اسانس و زمان گندزدایی ریزنمونه بر روی صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی

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

(میانگین هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی دار نیستند.)

نتایج آزمایش چهارم:

نتایج تجزیه واریانس اثر اسانس‌پاشی پایه‌های مادری و گرفتن ریزنمونه از آنها نشان دهنده اثر معنی داری بر روی اکثر صفات درون شیشه‌ای توت‌فرنگی بود. اثرات ساده نوع اسانس محلول‌پاشی شده بر روی میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها 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.

زمانیکه ریزنمونه‌های 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 ریزنمونه به شدت زیاد شد بگونه‌ایکه در کارواکرول، ۱۰۰ درصد و در تیمول ۴۰ درصد کشت‌ها از بین رفتند. اسانس‌پاشی پایه‌های مادری با اوژنول و سپس کشت آنها (با گندزدایی و بدون گندزدایی) هیچ‌گونه عوارض نامطلوبی بر روی ریزنمونه-ها نداشت. محلول پاشی گیاهان با اوژنول نتوانست میزان آلودگی باکتریایی را در پایه‌های مادری کاهش دهد و با شاهد تفاوت معنی داری نداشت ولی ریزنمونه-هایی 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 ریزنمونه‌ها گندزدایی شدند و چه نشدند، 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. ریزنمونه-های حاصل از پایه‌های اسانس‌پاشی شده با تیمول درصورت گندزدایی ۴۰ درصد و عدم گندزدایی ۳۰ درصد نسبت به شاهد آلودگی‌های باکتریایی کاهش یافت. عدم گندزدایی ریزنمونه‌های گرفته شده از سه تیمار محلول پاشی با اسانس‌های اوژنول، کارواکرول و تیمول هیچ اثری در کنترل آلودگی‌های قارچی نداشت ولی زمانیکه همین ریزنمونه‌ها با اوژنول ابتدا گندزدایی سطحی و سپس کشت شدند، ریزنمونه‌های گرفته شده از پایه‌های محلول‌پاشی بااوژنول، کارواکرول و تیمول به ترتیب شیوع قارچ ۸۴، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته بود (جدول ۴).

جدول ۴- اثر متقابل اسانس‌پاشی پایه‌های توت‌فرنگی و گندزدایی بر صفات درون شیشه‌ای کشت توت‌فرنگی

نوع ترکیب اسانس‌های محلول‌پاشی	نوع گندزدایی	صفات		
		میزان قهوه‌ای شدن (٪)	میزان آلودگی باکتریایی (٪)	میزان آلودگی قارچی (٪)
شاهد	-	۰c	۱۰۰a	۱۰۰a
اوژنول	بدون گندزدایی	۰c	۹۰ab	۱۰۰a
	با گندزدایی	۰c	۸۰b	۱۶/۶۶b
کارواکرول	بدون گندزدایی	۰c	۳۰d	۱۰۰a
	با گندزدایی	۱۰۰a	۱۵d	۰c
تیمول	بدون گندزدایی	۰c	۷۰bc	۱۰۰a
	با گندزدایی	۴۰b	۶۰c	۰c

(میانگین هایی که دارای حروف مشابهی هستند از لحاظ آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ معنی دار نیستند.)

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، نکروز بافت، کاهش شاخه‌زایی و ریشه دهی و 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 ریزنمونه‌ها، 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 ریزنمونه 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 ریزنمونه و عدم سمیت برای آن تعیین گردد (Gouran et al.,2012). باکتری ها و قارچ ها از مهمترین پاتوژن های مشکل ساز درکشت های درون شیشه ای هستند. بطورکلی یک ماده ضدعفونی کننده ایده آل باید در غلظت‌های پایین و به فرم های مواد طبیعی برعلیه دامنه زیادی از میکروبها موثر باشد. عوامل بسیاری برکارایی ضدعفونی کننده های شیمیایی و گندزداها تاثیر می‌گذارند. عواملی که باید در نظرگرفته شود شامل انواع میکروارگانیسمهای موجود، غلظت و ماهیت مواد ضدعفونی کننده و مدت زمان تیمار می باشد. امروزه مقاومت باکتریها و قارچها به قارچ کشها و باکتری کشهای 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، ائوجنول، لیمونین و بورنئول ممکن است جایگزینی مناسب برای از بین بردن میکروبهای مقاوم باشند. همچنین این ها یک سری مواد طبیعی هستند که علاوه بر ایمن بودن برای سلامتی بشر، سازگار با طبیعت نیز می باشند. فعالیت ضد قارچی فلفل سیاه علیه قارچهای *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus* و *Fusarium verticillioides* 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 گزارش شده است. در بررسی‌های متعددی گزارش شده که اوژنول، تیمول و کارواکرول بعنوان بیشترین اسانس های 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 آبگریزی است که آن ها را قادر می سازد در چربی‌های غشاء دیواره و میتوکندری سلولهای باکتری نفوذ کرده، به پروتئین‌های غشاء متصل شده، لیپوپلی‌ساکاریدها را آزاد کرده، و در نهایت باعث اختلال درساختمان و نفوذپذیری آنها گردد. در مرحله آخر، از دست رفتن محتویات سلول و خروج مولکولها و یون های حیاتی منجر به مرگ میکروبی می‌شود. نوع اسانس، غلظت و زمان در معرض قرار گرفتن ریز نمونه‌ها همگی

در میزان ضد میکروبی آلودگی‌های باکتریایی و قارچی موثر است. فعالیت قارچ کشی اسانس ها با غلظت آن ها رابطه زیادی دارد. کارواکرول دارای ساختار فنلی است که فعالیت ضد میکروبی آن بر روی باکتریها، قارچها و مخمر (Botelho et al. 2007; Martinez-Romero et al., 2007; Yahyazadeh et al., 2008) ثابت شده است. 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 ریزنمونه ها درشرایط درون شیشه ای در دسترس است. اثرات اسانس‌ها را به‌عنوان مواد ضدعفونی کننده بر روی شرایط استریل محیط کشت MS و رشد گره‌های داوودی بر روی محیط‌های تیمار شده گزارش کردند. آنها تکنیک جایگزینی عصاره-هایی 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 ریزنمونه‌ها، صدمات شدید بر روی بافت برگی توت‌فرنگی و آزاد شدن فنل و در نهایت مرگ ریزنمونه‌ها در طی این آزمایش بود که این اتفاق را می‌توان به طبیعت روغنی اسانس نسبت داد. توت فرنگی نیز مانند سایر جنس‌های خانواده رزاسه دارای ترکیبات فنلی زیادی است و در اثر تنش های زنده و غیرزنده مقدارآنها افزایش می یابد. درحین جداسازی ریز نمونه و پس از صدمه دیدن بافت، این ترکیبات با فعالیت پلی فنل اکسیدازها که در پلاست های سلول ها وجود دارند، اکسیدشده و موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت مزبور می گردند. محصولات این اکسیداسیون فعالیت آنزیمی را متوقف نموده وسبب تیره شدن بافت ها، عدم تثبیت ریزنمونه درمحیط کشت و در نهایت مرگ ریزنمونه می شود (Husain et al., 2007). بطور مشابهی گوران و همکاران (۱۳۹۲) اثرات سوختگی ریزنمونه‌های انگور را به دلیل وجود غلظت‌های زیاد اسانس‌ها در محیط کشت برخلاف قدرت بالای اسانس‌ها درکنترل 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 غلظت های پایین به عنوان عامل فعال سطحی برای کاهش کشش سطحی به جای مواد شیمیایی چون توین استفاده نمود که باید مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

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 ریزنمونه‌های برگی توت فرنگی 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 بافت-های گیاهی را داشت و اوژنول کمترین بازدارنده رشد در شرایط درون شیشه‌ای بود. گندزدایی سطحی ریزنمونه-ها 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.

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 Center3: 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.

Cassells, A.C. (2000). Aseptic microhydroponics: a strategy to advance microplant development and improve microplant physiology. Acta Hortic. 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. World Academy of Science, Engineering and Technology. 7 -06-24.

Gouran, A. Mozafari A. and Ghaderi, N. (2012). The effect of antimicrobial agents on the surface sterilized grape explants in in vitro culture *Vitis vinifera* L. 6th congress of the Agricultural Research findings. Kordestan university.

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). *Eugenia 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 aerugonosa*, *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, vol. 41, pp. 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 Resived and enlarged edition. Agrobios, Jodhpur, India

Martinez Romerro, 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 cierea* inoculated 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 cell. Dev. Biol. 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 *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.