

## بررسی اثر ضدقارچی اسانس چند گیاه دارویی و دو نوع پارابن در کشت درون شیشه‌ای گیاه سیب (*Malus domestica* cv. Gala)

### Antifungal Activity of Several Essential Oils of Medicinal Plants and Two Parabens on Apple (*Malus domestica* cv. Gala) In Vitro Culture

سیده‌زینب قاضی‌مطلق<sup>۱\*</sup>، علی تهرانی‌فر<sup>۲</sup>، حسین آروئی<sup>۳</sup> و وحید جهانبخش<sup>۴</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۷/۰۷

#### چکیده

آلودگی محیط در کشت‌بافت، یکی از مشکلات رایج می‌باشد که می‌تواند بخشی از کشت و یا تمامی آن را از بین ببرد. در این تحقیق، به منظور حذف و یا کاهش آلودگی القا شده توسط قارچ *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* در محیط کشت درون شیشه‌ای گیاهچه‌های سیب رقم گالا از اسانس دارچین، اسطوخودوس، مرزه، آویشن شیرازی، زیره سیاه و نعناع‌فلغلی و همچنین دو نوع پارابن استفاده گردید. آزمایشات اولیه نشان داد که بهترین اسانس برای کاهش درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ، اسانس دارچین با غلظت ۵۰ و ۷۵ پی‌پی‌ام و ماده متیل‌پارابن و پروپیل‌پارابن با غلظت‌های ۶۰۰ و ۲۲۵ پی‌پی‌ام می‌باشد. آزمایشات اندازه‌گیری رشد هیف، بیشترین رشد را مربوط به اسانس دارچین و کمترین را مربوط به تیمارهای متیل‌پارابن نشان داد. در تیمارهای مورد آزمایش جوانه‌زنی اسپور بهتر از رشد هیف کنترل شد. سپس ریزنمونه‌های گیاهان انتخابی سیب در محیط کشت MS همراه با اسانس و پارابن‌ها در غلظت‌های موردنظر کشت شدند. بهترین رشد گیاه سیب در اسانس دارچین مشاهده گردید. در مرحله بعد، تأثیر پارابن‌ها یا اسانس به‌همراه اسپور قارچ بر رشد گیاه در محیط کشت MS بررسی گردید. نتایج نشان داد که تیمارهای متیل‌پارابن و پروپیل‌پارابن با غلظت‌های ۶۰۰ و ۲۲۵ پی‌پی‌ام در کنترل جوانه‌زنی اسپور مناسب می‌باشند اما قادر به ممانعت از آلودگی محیط کشت نبوده و باعث صدمه به گیاه نیز می‌شوند. به‌طور کلی بهترین تیمار، اسانس دارچین با غلظت ۵۰ و ۷۵ پی‌پی‌ام معرفی می‌گردد.

**کلید واژه‌ها:** اسانس دارچین، پارابن، جوانه‌زنی اسپور، رشد هیف، گیاهچه سیب

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۲. استاد گروه علوم باغبانی و عضو پیوسته گروه گیاهان‌زینتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳. استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۴. استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

Email: ze\_gh12@yahoo.com

\* نویسنده مسئول

مقدمه

رشدونمو گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای، مرحله‌ی بیولوژیکی مهمی از علم کشت‌بافت گیاهی است که از نظر علمی و کاربرد تجاری اهمیت زیادی دارد. رشدونمو گیاهان حاصل از کشت‌بافت‌ها و سلول‌های گیاهی علاوه بر نمک‌های معدنی ضروری نیازمند ترکیبات گوناگونی از جمله هورمون‌های گیاهی، ویتامین‌ها و ساکارز در محیط کشت می‌باشد.

گوری و پاتل<sup>۱</sup> (1998) بیان داشتند چنین محیط‌کشتی که غنی از مواد غذایی است، می‌تواند زمینه رشد سریع باکتری‌ها و قارچ‌ها را نیز فراهم سازد و هرگونه آلودگی در محیط‌کشت، معمولاً به سرعت توسعه می‌یابد و با تخلیه مواد غذایی محیط‌کشت و تولید مواد سمی روی رشد گیاه تأثیر منفی گذاشته و سرانجام بافت گیاهی کشت شده را از بین می‌برد. از این رو به منظور تهیه و نگهداری سیستم کشت‌بافت استاندارد، ضدعفونی کامل محیط‌کشت غذایی، ظروف، بذور، بافت‌ها و همچنین هر وسیله‌ای که در کشت‌بافت به کار می‌رود، به‌وسیله‌ی گرما یا فیلتراسیون ضروری می‌باشد.

علاوه بر این، کل مراحل کشت‌بافت باید در جریان هوای تصفیه شده در زیر هود لومینار صورت پذیرد. علی‌رغم به-کارگیری این تمهیدات دقیق جهت حفظ شرایط استریل، آلودگی گیاهان کشت شده می‌تواند به‌عنوان مشکلی جدی، گاهی باعث از بین رفتن تعدادی و در مواردی سبب از بین رفتن تمامی گیاهان کشت شده گردد. با وجود این که گیاهان کشت شده در ابتدا استریل می‌باشند، میکروارگانیسم‌ها اغلب می‌توانند کشت‌ها را در هر زمانی در دوره‌ی رشد آلوده سازند. بنابراین لازم است که موادی مورد استفاده قرار گیرند که از آلودگی محیط‌کشت جلوگیری کرده و یا میزان آن را کاهش دهند و محیط‌کشت را در دوره رشد ریزنمونه، استریل نگه دارند.

قارچ‌ها به‌دلیل نداشتن کلروفیل قادر به ساختن غذای خود نبوده بلکه آن را از موجودات دیگر تأمین می‌کند. بعضی از قارچ‌ها مثل پنی‌سیلیوم از مرتباً تا چرم تغذیه می‌کنند، درحالی-که برخی دیگر دارای میزبان اختصاصی می‌باشند و فقط به یک گونه و حتی به یک وارسته حمله می‌نمایند (الهی‌نیا، ۱۳۷۵).

لیفرت و کاسلس<sup>۲</sup> (2001) گزارش کردند گونه‌های مختلف قارچ پنی‌سیلیوم، جز میکروارگانیسم‌های شاخصی است که در مرحله تهیه محیط‌کشت (چنانچه اتوکلاو به‌درستی انجام نشود) یا در زمان کشت گیاهان (چنانچه فیلتر استریل جریان هوا

1. Guri and Patel
2. Leifert and Cassells

به‌درستی کار نکند و یا کابینت هود و ابزارهای استفاده شده به‌درستی استریل نشود و یا تکنیک‌های ضدعفونی شخص انجام دهنده مناسب نباشد) و یا در زمان نگهداری محیط‌کشت و رشد گیاهان می‌توانند محیط‌کشت را آلوده کند. همچنین طبق گزارش *امامور*<sup>۳</sup> (2007) گونه‌های مختلف قارچ پنی‌سیلیوم باعث آلودگی رایج کشت درون شیشه‌ای نخل می‌باشند.

گوری و پاتل (1998)، انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها، قارچ-کش‌ها و مواد نگه‌دارنده گیاهی (Plant preservative mixture) = PPM را به‌منظور کاهش آلودگی محیط‌کشت به‌کار بردند.

خواص ضد میکروبی تعداد وسیعی از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به‌طور مکرر گزارش شده است و تلاش شده تا این تولیدات طبیعی به‌عنوان دسته‌بندی جدیدی از داروهای ضد میکروبی معرفی گردند (نائینی<sup>۴</sup> و همکاران، 2009).

ونگ<sup>۵</sup> و همکاران (2005) توانایی کنترل کامل چندین گونه از قارچ‌های پوسیدگی سفید و قهوه‌ای توسط اسانس دارچین (غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام) را گزارش کرده‌اند. *الباروتی*<sup>۶</sup> و همکاران (2010) نیز تأثیر مثبت اسانس دارچین در کنترل چهار قارچ *آسپرژیلوس نیگر*<sup>۸</sup>، *پنی‌سیلیوم نوتاتوم*<sup>۹</sup> و *موکورا هیمالیس*<sup>۱۰</sup>، *فوزاریوم اکسیسپروم*<sup>۱۱</sup> را گزارش کرده‌اند. نتایج GC نشان داده است که ۳۵ ترکیب شیمیایی مختلف در اسانس دارچین وجود دارد که بیشترین مقدار آن متعلق به سینامالدئید (۴۵/۱۳٪)، سینامیل‌الکل<sup>۱۲</sup> (۵/۱۳٪)، اوژنول (۷/۴۷٪)، متیل اوژنول<sup>۱۳</sup> (۵/۲۳٪)، اتیل سینامیت<sup>۱۴</sup> (۳/۸۶٪) و دی‌هیدرو اوژنول<sup>۱۵</sup> (۳/۳۱٪) می‌باشد (الباروتی و همکاران، 2010)

تحقیقات نشان داده است که اسانس مرزه خاصیت ضدقارچی بالایی علیه *بوتریتیس سینرا*<sup>۱۶</sup>، *رایزوپوس استلونیفرا*<sup>۱۷</sup>، *آسپرژیلوس پاراسیتیکوس*<sup>۱۸</sup> و *آسپرژیلوس*

3. Omamor
4. Naeini
5. Wang
6. Cinnamomum osmophloeum
7. El. Baroty
8. *Aspergillus niger*
9. *Penicillium notatum*
10. *Mucora heimalis*
11. *Fusarit oxysporum*
12. cinnamyl alcohol
13. methyl. eugenol
14. ethyl. cinnamate
15. dihydro. eugenol
16. *Botrytis cinerea*
17. *Rhizopus stolonifer*
18. *Aspergillus parasiticus*

محیط کشت بافت موراشیک و اسکوک و تأثیر آن‌ها بر رشدونمو گیاه سیب رقم گالا<sup>۲۰</sup> می‌باشد.

تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده اسانس‌های گیاهی و همچنین پارابن‌ها در محیط کشت گیاهچه سیب مشاهده نشده است.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه قارچ آلوده‌کننده محیط کشت

قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم از درون محیط کشت‌های درون شیشه‌ای گیاهچه سیب گالا، که به این قارچ آلوده شده بود، جدا گردید. پس از شناسایی قارچ در زیر میکروسکوپ، خالص‌سازی به روش تک‌اسپور نمودن بر مبنای روش آنکار و جمز<sup>۲۱</sup> (1995) انجام گرفته و سپس تکثیر و مورد استفاده قرار گرفت.

#### تهیه اسانس‌های گیاهی

تهیه اسانس از گل اسطوخودوس، برگ و ساقه‌ی مرزه، برگ و ساقه آویشن شیرازی، پوست درخت دارچین، به روش تقطیر و به کمک دستگاه کلونجر<sup>۲۲</sup> صورت گرفت و پس از چهار ساعت اسانس به‌دست آمده جمع‌آوری شد و اسانس زیره‌سیاه و نعناع-فلغلی به‌صورت آماده تهیه گردید. سپس مشابه روش زینگ<sup>۲۳</sup> (2010)، دو میلی‌لیتر از آن در حجمی برابر با توین<sup>۲۴</sup> حل گردید و با آب مقطر دوبار استریل به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد که در نهایت اسانس ۱۰۰۰۰۰ پی‌پی‌ام تهیه گردید.

#### تهیه مواد شیمیایی

دو ماده شیمیایی پروپیل ۴-هیدروکسی بنزوات (پروپیل پارابن) و متیل ۴-هیدروکسی بنزوات (متیل پارابن) که هر دو از مواد شیمیایی نگه‌دارنده غذایی و به‌ترتیب ساخت کارخانه SIGMA و FLUKA می‌باشند تهیه گردیدند.

برای تهیه محلول ذخیره موردنظر با توجه به گزارشات دیویدسون<sup>۲۵</sup> و همکاران (2002)، مبنی بر حلالیت پارابن‌ها در الکل، میزان ۰/۲ گرم از ماده شیمیایی در یک میلی‌لیتر الکل حل گردید. در این حالت غلظت محلول ۲۰۰۰۰ پی‌پی‌ام شد،

فلاووس<sup>۱</sup> دارد (ردی<sup>۲</sup> و همکاران، 1998؛ سوکمن<sup>۳</sup> و همکاران، 2004؛ رسولی و اولیا<sup>۴</sup>، 2005؛ ویودا/مارتوس<sup>۵</sup> و همکاران، 2007؛ یحیی‌زاده و همکاران، 2008).

نتایج لاموچی<sup>۶</sup> (2010) نشان داد اسانس آویشن<sup>۷</sup> و مرزه<sup>۸</sup> خاصیت بازدارنده علیه قارچ فوزاریوم گرامینروم<sup>۹</sup> دارند و در کاهش دی‌اکسی‌نیوانتول<sup>۱۰</sup> تولیدی توسط فوزاریوم گرامینروم مؤثر می‌باشند.

رزاقی/آببانه (2009) اسانس گیاه زیره‌سیاه<sup>۱۱</sup> را علیه قارچ آسپرژیلوس پاراسیتیکوس و تولید آفلاتوکسین (AFB<sub>1</sub>)B<sub>1</sub> و آفلاتوکسین (AFG<sub>1</sub>) G<sub>1</sub> توسط این قارچ بررسی کرد. نتایج نشان داد که اسانس زیره‌سیاه بازدارنده تولید آفلاتوکسین توسط قارچ می‌باشد اما تأثیری روی رشد قارچ ندارد.

همچنین گزارش شده است اسطوخودوس<sup>۱۲</sup> در غلظت (۱٪) و (۱۰٪) از جوانه‌زنی کنیدیوم و رشد لوله تندش قارچ‌های بوتریتیس سینرا<sup>۱۳</sup> جلوگیری می‌کند (آنتونوف<sup>۱۳</sup> و همکاران 1997)

نتایج هال<sup>۱۴</sup> (2004) نشان داد قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم رشد یافته در محیط حاوی اسانس نعناع‌فلغلی<sup>۱۵</sup> دارای رشدی ضعیف و فاقد هرگونه اسپوردهی است.

هدف از این تحقیق بررسی خواص ضدقارچی اسانس گیاهان دارویی دارچین، مرزه، آویشن شیرازی<sup>۱۶</sup>، اسطوخودوس، زیره‌سیاه و نعناع‌فلغلی و همچنین دو ماده شیمیایی نگهدارنده مواد غذایی<sup>۱۷</sup> پروپیل ۴-هیدروکسی بنزوات<sup>۱۸</sup> (پروپیل پارابن) و متیل ۴-هیدروکسی بنزوات<sup>۱۹</sup> (متیل پارابن) در کاهش آلودگی ایجاد شده توسط قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم بر روی

1. *Aspergillus flavus*
2. Reddy
3. Sokmen
4. Rasooli and Owlia
5. Viuda martos
6. Lahooji
7. Zataria
8. *Satureja hortensis*
9. *Fusarium graminearum*
10. deoxynivaneol
11. *Carum carvil*
12. *Lavandula officinalis*
13. Antonov
14. Hall
15. *Mentha Pipereta*
16. *Zataria multiflora*
17. Food additive
18. Propyl 4. hydroxybenzoate
19. Methyl 4. hydroxybenzoate

20. Gala
21. Onkar and James
22. Clevenger
23. Xing
24. Tween
25. Davidson

سیس با توجه به غلظت مورد نیاز، به کمک سمپلر از محلول تهیه شده برداشت شده و به محیط کشت اضافه گردید.

### پیش‌آزمون جوانه‌زنی و رشد هیف قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم با اسانس‌ها و پارابن‌های موردنظر

بدین‌منظور برای هر یک از تیمارها، محیط‌کشت جامد MS حاوی ترکیب هورمونی ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA)، سه درصد ساکارز، نه گرم در لیتر آگار و pH برابر ۵/۷ آماده گردید و به‌کمک دستگاه اتوکلاو استریل گردید. سپس در زیر هود لومینار (به‌دلیل حساسیت اسانس به گرما، اضافه نمودن آنها پس از اتوکلاو و رسیدن به دمای مناسب صورت پذیرفت) برای تهیه غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ پی‌پی‌ام برای هر یک از اسانس‌های اسطوخودوس، مرزه، آویشن شیرازی، دارچین، زیره سیاه و نعناع‌فلفلی میزان ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرولیتر از محلول ذخیره اسانس تهیه شده، و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS اضافه گردید، سپس در پنج پتری‌دیش هر کدام به میزان ۲۰ میلی‌لیتر توزیع شد. (۵ تکرار). یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰<sup>۴</sup> اسپور (پس از تهیه سوسپانسیون، توسط لام هموسی‌تومتر شمارش اسپور شده و بعد به دفعات لازم عمل رقیق‌سازی بر روی آن انجام شد تا غلظت موردنظر به‌دست آید) به هر یک از پتری‌دیش‌ها اضافه گردید و در سطح پتری‌دیش به‌صورت یکنواخت پخش شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت روند جوانه‌زنی اسپورها در هر یک از تیمارهای حاوی اسانس و شاهد در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

در مورد پارابن‌ها نیز غلظت‌های ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام برای متیل‌پارابن و غلظت‌های ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ و ۲۲۵ پی‌پی‌ام برای پروپیل‌پارابن مورد بررسی قرار گرفت (غلظت موردنظر با توجه به پیش‌تیمارهای انجام شده بر کنترل قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم و گزارشات موجود سعد<sup>۱</sup> و همکاران (2005) و والکوا<sup>۲</sup> و همکاران (2001) مبنی بر قوی‌تر بودن پروپیل‌پارابن نسبت به متیل‌پارابن انتخاب گردید). در این مورد نیز پس از تهیه محیط‌کشت و استریل آن، پارابن‌ها در غلظت‌های موردنظر در زیر هود لومینار به محیط‌کشت افزوده شد. برای این منظور برای تهیه غلظت‌های ۴۰۰، ۴۵۰، ۵۰۰، ۵۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام برای متیل‌پارابن به‌ترتیب میزان ۲۰۰، ۲۲۵، ۲۵۰، ۲۷۵ و ۳۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره موردنظر و برای تهیه غلظت‌های ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ و ۲۲۵ پی‌پی‌ام پروپیل‌پارابن به‌ترتیب میزان ۷۵، ۸۷/۵، ۱۰۰ و ۱۱۲/۵

میکرولیتر از محلول ذخیره موردنظر برداشته شد و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS اضافه گردید، سپس در پنج پتری‌دیش هر کدام به میزان ۲۰ میلی‌لیتر توزیع شد (۵ تکرار) و همانند آن‌چه درباره اسانس گفته شد سوسپانسیون قارچ به محیط اضافه گردید و بعد از گذشت ۲۴ ساعت روند جوانه‌زنی اسپورها در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله اسانس‌ها یا پارابن‌هایی که توانسته بودند جوانه‌زنی اسپور قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم را کنترل و یا کاهش دهند شناسایی شدند و به مرحله اندازه‌گیری رشد هیف انتقال یافتند.

برای اندازه‌گیری رشد هیف نیز مانند مرحله قبلی محیط‌کشت MS حاوی اسانس و پارابن مربوطه تهیه گردید و سپس مشابه روش سمیع و همکاران (۱۳۸۹) به کمک چوب پنبه سوراخ کن قطعه‌ای از قارچ به قطر پنج میلی‌متر در پنج میلی‌متر جدا گردید و در مرکز پتری‌دیش حاوی محیط‌کشت MS تیمار شده قرار گرفت و پس از گذشت ۱۵ روز به کمک خط‌کش، میزان رشد هیف قارچ اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری رشد گیاه و درصد آلودگی با تیمارهای منتخب در شرایط درون‌شیشه‌ای

در این مرحله تیمارهای منتخب از مرحله پیش‌آزمون که توانسته بودند رشد قارچ را کاهش دهند انتخاب گردیدند و محیط‌کشت جامد MS حاوی ترکیبات و pH ذکر شده در مراحل قبلی تهیه گردید و پس از افزودن تیمارها (اسانس یا پارابن در غلظت‌های موردنظر) آزمایشات در سه گروه انجام پذیرفت.

۱- محیط‌کشت حاوی تیمار اسانس یا پارابن به‌همراه گیاه (به-منظور بررسی اثر اسانس یا پارابن بر رشد گیاه).

۲- محیط‌کشت حاوی تیمار اسانس یا پارابن به‌همراه گیاه و اسپور قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم (به‌منظور بررسی اثر همزمان قارچ و تیمارهای افزوده شده بر رشد گیاه).

۳- محیط‌کشت حاوی تیمار اسانس یا پارابن به‌همراه اسپور قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم (به‌منظور مقایسه درصد آلودگی محیط‌کشت با زمانی که گیاه در محیط حضور دارد).

سپس در محیط‌های دارای گیاه، قطعه‌ای به طول ۱/۵ سانتی‌متر از ساقه گیاه سیب<sup>۳</sup> رقم گالا که هر کدام دارای یک برگ سالم و سبز بودند (حدالامکان مشابه و همسن) جدا گردید و در محیط‌کشت استقرار یافتند و درب ظروف به وسیله

1. Saad  
2. Valkova

3. *Malus domestica*

رشد اسپورها اندازه گیری رشد هیف مشکل بود) نشان داد، در این غلظت‌ها رشد هیف همچنان صورت می‌پذیرد و در مدت ۱۵ روز، پس از تیمار شاهد، بیشترین رشد هیف مربوط به تیمارهای دارچین و کمترین آن مربوط به تیمارهای متیل‌پارابن بود. در نهایت تیمار دارچین ۵۰ و ۷۵ پی‌پی‌ام، متیل‌پارابن ۵۰، ۵۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام و پروپیل‌پارابن ۲۰۰ و ۲۲۵ پی‌پی‌ام برای انجام ادامه آزمایشات انتخاب شدند.

آزمایش ۲- اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها بر رشد گیاهچه سیب نتایج حاصل از تاثیر اسانس و پارابن‌ها بر رشد گیاهان سیب در شرایط درون‌شیشه‌ای، با استفاده از تیمارهای برتر (حاصل از نتایج پیش‌آزمون) که تأثیر بهتری در کنترل جوانه‌زنی اسپور نشان دادند (تیمار کنترل، تیمار دارچین ۵۰ و ۷۵ پی‌پی‌ام، متیل‌پارابن ۵۰، ۵۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام و پروپیل‌پارابن ۲۰۰ و ۲۲۵ پی‌پی‌ام) بر صفات مورفولوژیکی گیاهچه سیب (تعداد برگ، ارتفاع، وزن تر و وزن خشک) در جدول زیر آورده شده است.

اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها در غلظت‌های مورد آزمایش بر تعداد برگ گیاهچه سیب در سطح احتمال ۰/۰۱ /درحالی معنی‌دار شد که همه تیمارها با شاهد تفاوت معنی‌داری از خود نشان دادند (شکل ۲A).

در مورد ارتفاع، با افزایش غلظت تیمارها، از ارتفاع گیاهچه سیب کاسته شد. بیشترین ارتفاع پس از تیمار شاهد، مربوط به تیمارهای متیل‌پارابن سپس تیمارهای پروپیل‌پارابن و در انتها تیمار دارچین بود (شکل ۲B).

وزن تر گیاهچه سیب نیز با افزایش غلظت در هر یک از تیمارها کاهش یافت. بیشترین وزن پس از تیمار شاهد، مربوط به متیل ۴-هیدروکسی‌بنزوات ۵۰۰ پی‌پی‌ام بود و کمترین وزن تر در تیمارهای دارچین ۷۵ پی‌پی‌ام و پروپیل ۲۲۵ پی‌پی‌ام مشاهده شد. بین تیمارهای دارچین ۵۰ پی‌پی‌ام، متیل‌پارابن ۵۵۰، ۶۰۰ پی‌پی‌ام و پروپیل‌پارابن ۲۰۰ پی‌پی‌ام اختلافی وجود نداشت (شکل ۲C).

با افزایش غلظت تیمار، وزن خشک گیاهچه سیب نیز کاهش یافت. بیشترین وزن خشک پس از تیمار شاهد، مربوط به تیمار متیل ۴-هیدروکسی‌بنزوات ۵۰۰ پی‌پی‌ام و کمترین آن متعلق به تیمار دارچین ۷۵ پی‌پی‌ام بود. سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (شکل ۲D).

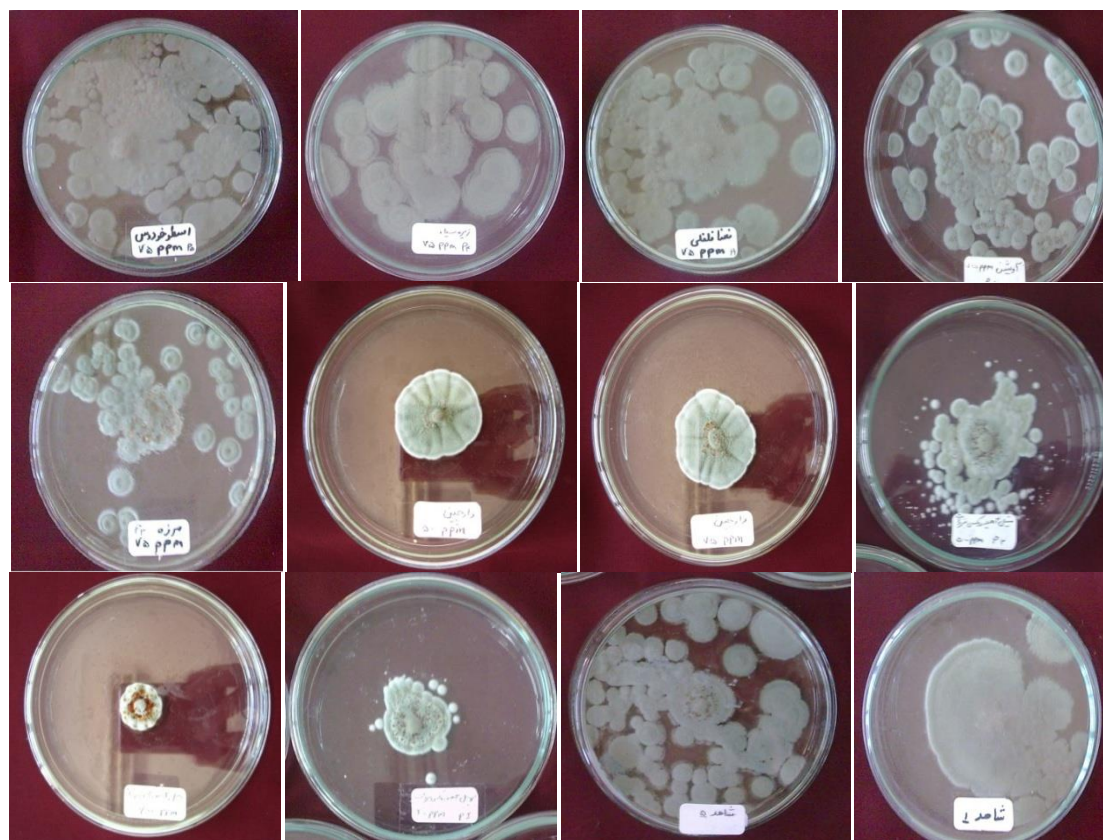
فویل آلومینیوم کاملاً مسدود گردید و در محیط‌های حاوی اسپور قارچ نیز، میزان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی  $10^4$  اسپور به هر یک از پتری‌دیش‌ها اضافه گردید. پس از کشت، محیط‌های کشت به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از یک ماه میزان آلودگی ظروف کشت شده بررسی شد و همچنین گیاهان از نظر صفات مورفولوژیکی (تعداد برگ، ارتفاع گیاه، وزن تر و وزن خشک) در مقایسه با شاهد هر گروه مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمایشات به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار صورت گرفت و آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و نرمال‌سازی داده‌های درصدی با استفاده از فرمول  $ASIN(A_n^{0.5}) * 180/3.14$  و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم گردیدند.

## نتایج و بحث

آزمایش ۱- نتایج حاصل از پیش‌آزمون بازدارندگی رشد قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم

بررسی‌های انجام شده در زیر میکروسکوپ نشان داد، در میان غلظت‌های مختلف به‌کار رفته از اسانس‌های دارچین، اسطوخودوس، مرزه، آویشن شیرازی، زیره سیاه و نعناع‌فلفلی، تنها در اسانس دارچین با غلظت ۵۰ و ۷۵ پی‌پی‌ام در کل دوره آزمایش (۲۵ روز) هیچ‌گونه جوانه‌زنی اسپور مشاهده نگردید. اما در سایر اسانس‌ها، در همه غلظت‌های به‌کار رفته در همان روزهای اولیه جوانه‌زنی اسپور شروع شد و با گذشت زمان افزایش یافت. چنان‌چه پس از گذشت چهار، پنج روز کل سطح پتری‌دیش پوشیده از کلونی‌های قارچ شد و با چشم غیرمسلح به‌راحتی قابل مشاهده بود. در مورد پارابن‌ها، متیل‌پارابن در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام در کل دوره آزمایشی (۲۵ روز) و پروپیل‌پارابن در غلظت ۲۲۵ پی‌پی‌ام به‌مدت ۱۸ روز از جوانه‌زنی اسپور جلوگیری کردند. اما نتایج حاصل از رشد هیف (که تنها در مورد اسانس دارچین و پارابن‌هایی که از جوانه‌زنی اسپور جلوگیری کرده بودند صورت پذیرفت، زیرا در سایر اسانس‌ها به دلیل پراکندگی اسپور قارچ در سطح محیط‌کشت و



شکل ۱: تأثیر اسانس مختلف و پارابن‌ها بر رشد هیف قارچ پنی سیلیوم دیجیتاتوم پس از گذشت ۱۵ روز. تصاویر از چپ به راست به- ترتیب: اسطوخودوس ۷۵ پی‌پی‌ام، زیره سیاه ۷۵ پی‌پی‌ام، نعناع فلفلی ۷۵ پی‌پی‌ام، آویشن شیرازی ۷۵ پی‌پی‌ام، مرزه ۷۵ پی‌پی‌ام، دارچین ۷۵ پی‌پی‌ام و متیل پارابن ۵۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام، پروپیل پارابن ۲۰۰ پی‌پی‌ام و شاهد‌ها

Fig. 1: Effect of various essential oil and parabens on growth hyphea *Penicillium digitatum* fungi after 15 days. left to right: *Lavandula officinalis* 75 ppm, *Carum carvi* 75 ppm, *Mentha piperata* 75, *Zataria multiflora* 75 ppm, *Satureja hortensis* 75 ppm, ppm *Cinnamomum verum* 75 ppm, methyl paraben 500 and 600 ppm and propyl paraben 200 ppm and controls

جدول ۱: جدول تجزیه واریانس اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها بر تعداد برگ، ارتفاع، وزن تر و وزن خشک گیاهچه سیب

Table1: Effect of cinnamon essential oil and parabens on leaf number, height, fresh weight and dry weight of apple plantlets cv. Gala

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات
Source of variation	Degree of freedom	تعداد برگ	ارتفاع	وزن تر	خشک
		MS of Leaf number	MS of Height	MS of Fresh weight	MS of Dry weight
تیمار	7	1087.199**	1.319**	106023.66**	5115.84**
Treatment					
خطا	32	18/273	0.178	3225.26	106.09
Error					

\*\* : معنی دار در سطح احتمال ۱٪

\*\* : significant at  $P \leq 0.01$

پروپیل پارابن ۲۰۰ و ۲۲۵ پی پی ام) بر میزان آلودگی شیشه‌های مورد استفاده در کشت گیاهان و تأثیر وجود یا عدم وجود گیاه در میزان آلودگی شیشه‌ها، آزمایشاتی شامل هر یک از تیمارهای منتخب به همراه اسپور قارچ در دو گروه همراه گیاه و بدون گیاه صورت پذیرفت.

طبق نمودار زیر در تیمار دارچین (همان‌طور که نتایج پیش‌آزمون نشان داد که در غلظت ۵۰ و ۷۵ پی پی ام دارچین در کل دوره آزمایشی هیچ‌گونه جوانه‌زنی اسپور صورت نگرفت) هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نشد درحالی‌که در پارابن‌ها به-خصوص در غلظت‌های بالا (۶۰۰ متیل پارابن و ۲۲۵ پروپیل-پارابن) که جوانه‌زنی اسپور بسیار کمی برای آن محاسبه گردیده بود و انتظار می‌رفت درصد آلودگی به میزان کمی مشاهده گردد، اما برخلاف انتظار درصد آلودگی ظروف کشت قابل توجه بود. نتایج راشا و غسان<sup>۱۰</sup> (2008) نشان داد که عصاره متانولی، هگزانی و آبی دارچین به‌طور کامل از رشد پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم جلوگیری می‌کند. عصاره متانولی بیشترین فعالیت ضدقارچی و به‌دنبال آن عصاره هگزانی و آبی دارچین بیشترین فعالیت را نشان داد. هال<sup>۱۱</sup> (2004) نیز بیان کرد، رشد و اسپوردهی قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم در محیط حاوی اسانس دارچین به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. اثر بالای دارچین ممکن است به سینامالدهید، اتانول، اسیدسینامیک مربوط باشد. اینوی<sup>۱۲</sup> و همکاران (2000)، جیل و هالی<sup>۱۳</sup> (2004) گزارش کردند که این فعالیت اساساً ممکن است به سینامالدهید مربوط شود که بازدارنده ویژه‌ای برای آنزیم‌هایی همچون بی- (۱،۳) گلوکان‌سیتاز<sup>۱۴</sup> است که در بیوسنتز کتین<sup>۱۵</sup> و بی-گلوکانس<sup>۱۶</sup> دیواره سلولی شرکت می‌کند.

بومر<sup>۱۷</sup> (1976)، واتانابه و تاکسو<sup>۱۸</sup> (1962) بیان کردند پارابن‌ها در مرحله جوانه‌زنی و فاز رشد رویشی میکروارگانیسم‌ها فعالیت می‌کنند. اما جوانه‌زنی اسپور نسبت به فاز رویشی قارچ‌ها و باکتری‌ها حساسیت بیشتری نسبت به پارابن‌ها دارند. مطابق با نتایج بومر (1976)، واتانابه و تاکسو (1962) این‌طور به‌نظر می‌رسد که مسدود بودن درب ظروف با

پنگفی<sup>۱</sup> و همکاران (2013) تأثیر ناتامایسین<sup>۲</sup> (نگه‌دارنده غذایی) را در غلظت‌های مختلف بر رشد گیاه برنج و آرابیدوپسیس در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد در گیاه برنج و آرابیدوپسیس درصد سرعت جوانه‌زنی بذور، درصد سرعت تکثیر کالوس در غلظت ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ تفاوتی با شاهد (فاقد ناتامایسین) نداشت. اما درصد القای کالوس و طول ریشه دانه‌ها با افزایش غلظت از ۱۰ به ۳۰ کاهش معنی‌داری با شاهد داشت. فعالیت ضدقارچی ناتامایسین در ارتباط با اتصال آن به استرول غشای سلولی به‌خصوص آرگوسترول است. نتایج نشان داد استفاده از ناتامایسین در گیاهان با افزایش غلظت از ۰ به ۳۰ سبب افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید<sup>۳</sup> در گیاهان و کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز<sup>۴</sup> و پراکسیداز<sup>۵</sup> می‌شود، اما تأثیری در فعالیت آنزیم کاتالاز<sup>۶</sup> ندارد.

تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده اسانس یا عصاره گیاهی در محیط کشت گیاهچه سیب مشاهده نشده است. اما مارینو و گاجیا<sup>۷</sup> (2009)، در پژوهشی تأثیر عصاره زیتون تلخ<sup>۸</sup> در کشت درون‌شیشه‌ای شاخه‌های آلو<sup>۹</sup> (هم خانواده با سیب، خانواده رزاسه) را روی وزن گیاهچه‌های رشد یافته ارزیابی کردند.

نتایج نشان داد با افزایش میزان عصاره در محیط کشت MS، وزن تر گیاهچه‌ها به‌ترتیب کاهش یافت و در غلظت‌های بالا بیشتر شاخه‌ها دچار مرگ شدند و از بین رفتند. براساس نتایج به‌دست آمده حاصل از آزمایشات حاضر و نتایج پنگفی و همکاران (2013) و مارینو و گاجیا (2009) افزودن مواد نگه‌دارنده به محیط کشت، به‌دلیل تغییر شرایط مساعد رشد گیاه و تغییر در فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات درونی گیاه، همچنین اثرات سمی مواد نگه‌دارنده روی رشد و سوختگی گیاهان، با تأثیر منفی بر تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها، باعث کاهش معنی‌دار رشد می‌شود.

آزمایش ۳- اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها همراه گیاه و بدون گیاه بر میانگین مربعات درصد آلودگی هر واحد محیط کشت به‌منظور تعیین تأثیر تیمارهای منتخب (تیمار شاهد، دارچین ۵۰ و ۷۵ پی پی ام، متیل پارابن ۵۰۰، ۵۵۰ و ۶۰۰ پی پی ام و

10. Rasha and Ghassan  
11. Hall  
12. Inouye  
13. Gill and Holly  
14. B. (1,3). glucansynthase  
15. Chitin  
16. B. glucans  
17. Bomar  
18. Watanabe and Takesue

1. Pengfei  
2. Natamycin  
3. Malondialdehyde  
4. Superoxide dismutase  
5. Peroxidase  
6. Catalase  
7. Marino and Gaggia  
8. *Melia azedarach*  
9. *Prunus cerasifera* × *Prunus spinosa*

بررسی اثر ضدقارچی اسانس چند گیاه دارویی و نوع پارابن در کشت...

فویل آلومینیوم و عدم هر گونه تبادل هوا با بیرون و در نتیجه حضور قطرات آب بر جداره ظروف کشت، موجب گردیده تا اسپورهای قارچ اضافه شده به محیط کشت از رطوبت موجود جداره ظرف استفاده کرده و جوانه زنی اسپور صورت گرفته باشد و از آنجا که این غلظت‌ها مانع جوانه زنی اسپور قارچ گردیده، نه رشد هیف، در نتیجه پس از جوانه زنی، رشد هیف ادامه یافته و باعث آلودگی ظروف گردیده است. همان‌طور که در تصویر شماره ۵ مشخص است آلودگی ظروف کشت، همیشه از جداره ظروف شروع شده و به سمت مرکز پیشروی می‌کند. اما در تیمارهای دارچین به نظر می‌رسد که اسانس دارچین نه تنها سطح، بلکه فضای درونی ظروف را نیز استریل کرده است و احتمالاً ترکیبات اسانس دارچین باعث از بین رفتن اسپورهای قارچ پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم گردیده است که با نتایج اینووی و همکاران (2000)، جیل و هالی (2004) مطابق است.

نتایج حاصل از آزمایشات حاضر نشان داد، کاربرد ۶۰۰ پی‌پی‌ام متیل‌پارابن و ۲۲۵ پی‌پی‌ام پروپیل‌پارابن در محیط کشت گیاهچه‌های سیب رقم گالا، درصد آلودگی را از ۱۰۰ درصد در تیمار شاهد به ۳۰ درصد در تیمار پارابن‌ها کاهش داد.

آیانگ<sup>۱</sup> و همکاران (2003) نیز به منظور استریل محیط کشت کشت MS بدون اتوکلاو گیاه گندواش<sup>۲</sup>، نگه‌دارنده‌های غذایی سدیم بنزوات، پتاسیم سورات، اتیل‌پارابن را به کار بردند. نتایج نشان داد سدیم بنزوات، پتاسیم سورات در غلظت‌های به کار رفته تأثیر بسزایی در حذف آلودگی نداشتند. در تیمار اتیل‌پارابن با افزایش غلظت از ۲۰۰ به ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، شروع آلودگی باکتریایی از ۴ رو به ۱۷ روز به تأخیر افتاد، اما محیط کشت در این تیمارها فاقد آلودگی قارچی بود.

پنگفی و همکاران (2013)، تأثیر ناتامایسین (افزودنی خوراکی) را در غلظت‌های مختلف علیه چندین گونه قارچی در محیط PDA، MS، N6 مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ناتامایسین در هر سه محیط کشت علیه همه قارچ‌های به کار رفته (از جمله گونه‌های قارچ پنی‌سیلیوم) ۱۰۰٪ تأثیر مثبت داشت.

روش عمل پروپیل‌پارابن از طریق جداکردن فسفر اکسید شده<sup>۳</sup>، جلوگیری از لینک NAD<sup>+</sup> و FAD تنفس میتوکندریایی و کاهش غشای پتانسیل میتوکندری است

(ناکاگاو و مالدئوس<sup>۴</sup>، 1998؛ سونی<sup>۵</sup> و همکاران، 2001). نتایج پژوهش نِس و اِکلاند<sup>۶</sup> (1983) نشان داد که تأثیر پارابن‌ها روی روی غشای سلول در ارتباط با ساختار و تشکیل پروتئین RNA و DNA باکتریایی است.

بر طبق نتایج حاصل از آزمایش ذکر شده در این جا و نتایج آیانگ و همکاران (2003) و پنگفی و همکاران (2013)، ناکاگاو و مالدئوس، (1998)؛ سونی و همکاران، (2001)، نتایج پژوهش نِس و اِکلاند (1983) افزودن ترکیبات ضدقارچی و باکتریایی به محیط کشت گیاهان، بسته به نوع ترکیب، غلظت آن و نوع آلودگی موجود در محیط کشت و با اختلال در مسیر واکنش‌های درون سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌تواند در استریل محیط کشت مؤثر باشد.

آزمایش ۴- اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها بر صفات مورفولوژیکی گیاهچه سیب رقم گالا به همراه قارچ پنی‌سیلیوم نتایج تجزیه واریانس تیمارهای به کار رفته (تیمار شاهد بدون اسپور قارچ و همراه گیاه، تیمار شاهد همراه با اسپور قارچ و همراه گیاه، تیمار دارچین ۵۰ و ۷۵ پی‌پی‌ام، متیل‌پارابن ۵۵۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ پی‌پی‌ام و پروپیل‌پارابن ۲۰۰ و ۲۲۵ پی‌پی‌ام به همراه گیاه و اسپور قارچ) بر تعداد برگ، ارتفاع ساقه، وزن تر و وزن خشک گیاهچه سیب رقم گالا در جدول زیر آورده شده است.

از نظر تعداد برگ، بین تیمارهای منتخب اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ مشاهده نگردید، در حالی که تمامی تیمارهای منتخب از این لحاظ اختلاف معنی‌داری با شاهد بدون قارچ از خود نشان دادند. در عین حال تعداد برگ در تیمارهای مختلف از تعداد برگ در تیمار شاهد به همراه قارچ بیشتر بود (شکل ۴A).

در مورد ارتفاع گیاهچه سیب، مقایسه میانگین داده‌های آزمایشی نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تمام تیمارها با شاهد همراه قارچ و بدون قارچ وجود داشت. بیشترین ارتفاع در تیمار شاهد بدون قارچ و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد همراه قارچ بود. برعکس حالت بدون قارچ در تیمار متیل ۴- هیدروکسی بنزوات، با افزایش غلظت از ۵۵۰ به ۶۰۰ پی‌پی‌ام، کاهش ارتفاع گیاهچه وجود نداشت، بلکه افزایش ارتفاع مشاهده گردید. شاید بتوان گفت تأثیر ماده شیمیایی از یک سو و اثر قارچ از سوی دیگر موجب کاهش این ارتفاع گردیده است. اما در متیل ۴- هیدروکسی بنزوات ۶۰۰ پی‌پی‌ام به دلیل آلودگی

4. Moldeus and Moldeus

5. Sony

6. Nes and Eklund

1. Ouyang

2. *Artemisia annua*

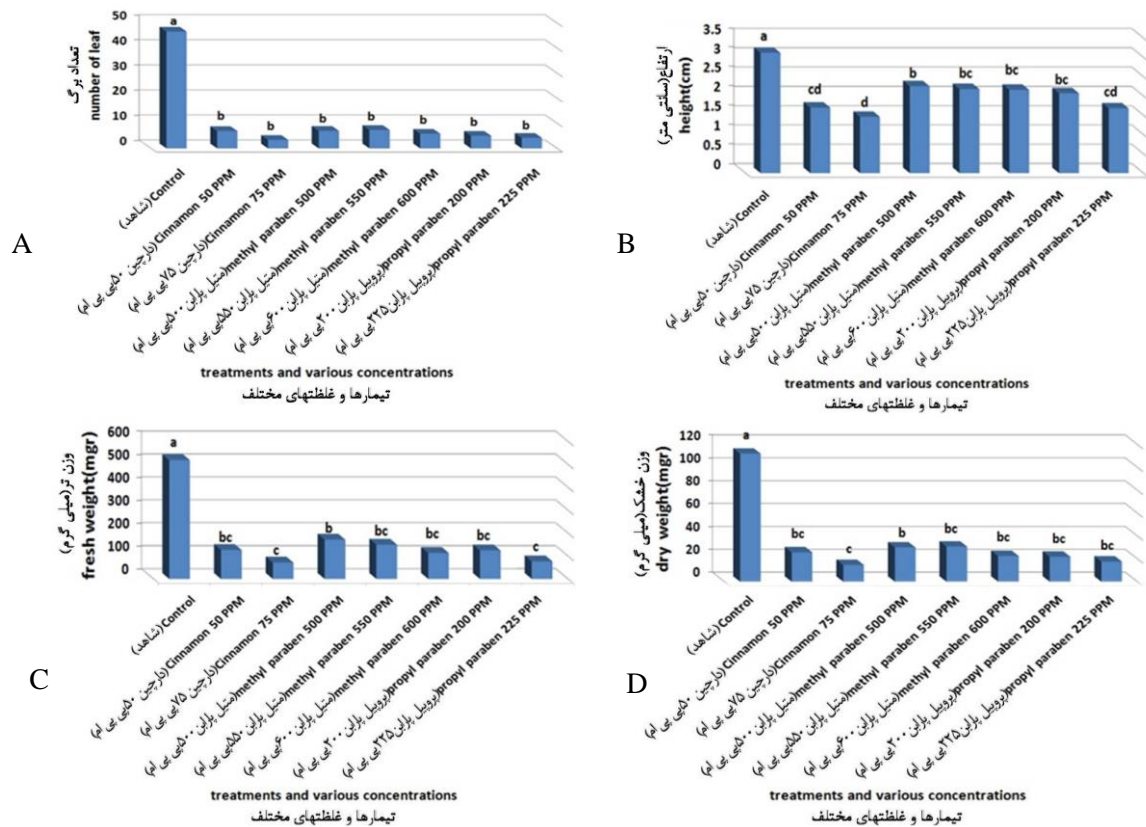
3. oxidation phosphorylation



در مورد وزن خشک گیاهچه سیب، بین تیمارهای حاوی ماده افزودنی به محیط کشت اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در عین حال تفاوت معنی داری بین آنها و هردو تیمار شاهد وجود داشت (شکل ۴D).

کمتر توسط قارچ، اثر قارچ روی ارتفاع تا حدی مرتفع شده است (شکل ۴B).

در ارتباط با وزن تر، بین تیمارهای حاوی ماده ضد قارچ اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد. در این میان بیشترین وزن تر در متیل پارابن ۵۰۰ پی پی ام و کمترین آن در دارچین ۷۵ پی پی ام مشاهده شد (شکل ۴C).



شکل ۲: اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها بر تعداد برگ، ارتفاع ساقه، وزن تر و وزن خشک گیاهچه سیب

حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح ۰.۱٪ می باشد

Fig. 2: Effect of cinnamon essential oil and parabens on leaf number, height, fresh weight and dry weight of apple plantlets cv. Gala

Mean having various followed letters are significantly different at 1% level

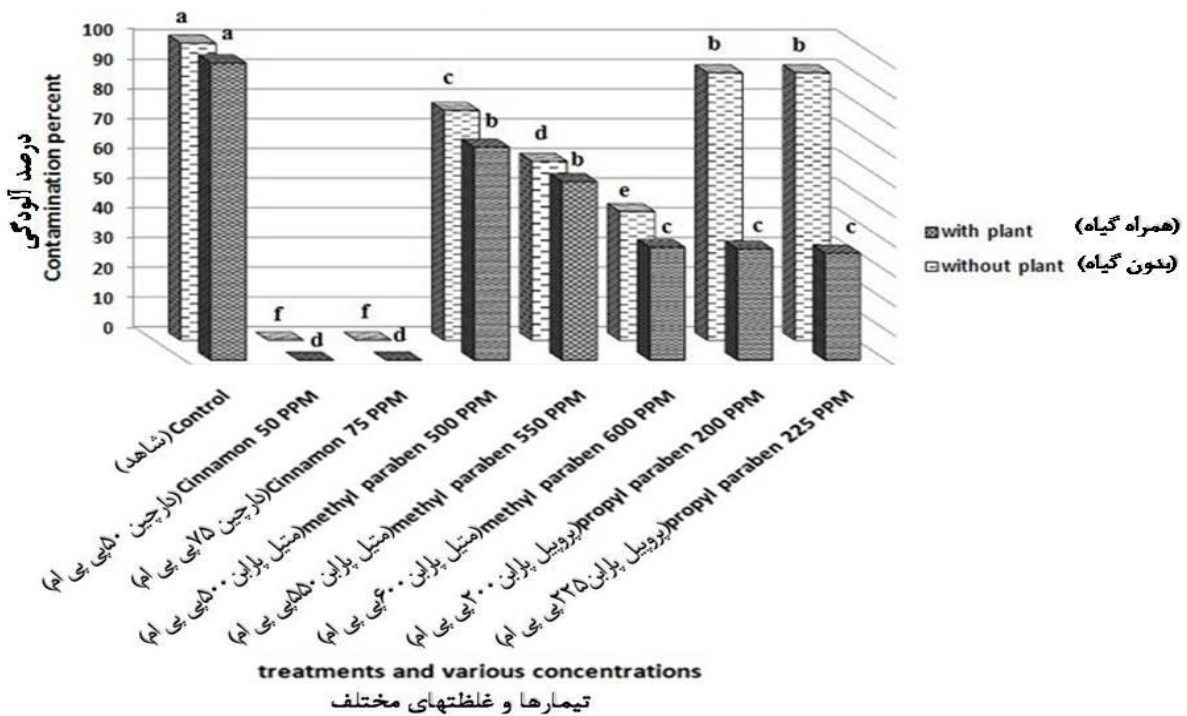
جدول ۲: جدول تجزیه واریانس اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها همراه گیاه و بدون گیاه بر درصد آلودگی هر واحد کشت

Table 2: Effect of cinnamon essential oil and parabens with and without plant on contamination percentage per vials

میانگین مربعات همراه با گیاه MS (With plant)	میانگین مربعات بدون گیاه MS (without plant)	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییرات Source of variation
5832.856**	7954.189**	7	تیمار Treatment
244.964	34.039	32	خطا Error

\*\* : معنی دار در سطح احتمال ۱٪

\*\* : significant at  $P \leq 0.01$



شکل ۳: اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها همراه گیاه و بدون گیاه بر درصد آلودگی هر واحد کشت

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱٪ می‌باشند

Fig. 3: Effect of cinnamon essential oil and parabens with and without plant on percentage of contamination per vials  
Mean having various followed letters are significantly different at 1% level

جدول ۳: جدول تجزیه واریانس اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها به همراه قارچ پنی‌سیلیوم بر تعداد برگ، ارتفاع ساقه، وزن تر و وزن خشک گیاهچه سیب رقم گالا

Table 3: Effect of cinnamon essential oil and parabens with *Penicillium digitatum* fungi on leaf number, height, fresh weight and dry weight of apple plantlets cv. Gala

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات
Source of variation	Degree of freedom	MS of Leaf number	MS of height	MS of Fresh Weight	MS of Dry weight
تیمار	8	1029.59**	3.25**	108318.55**	5097.65**
خطا	36	15.90	0.13	2294.63	96.17

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

\*\* : significant at  $P \leq 0.01$

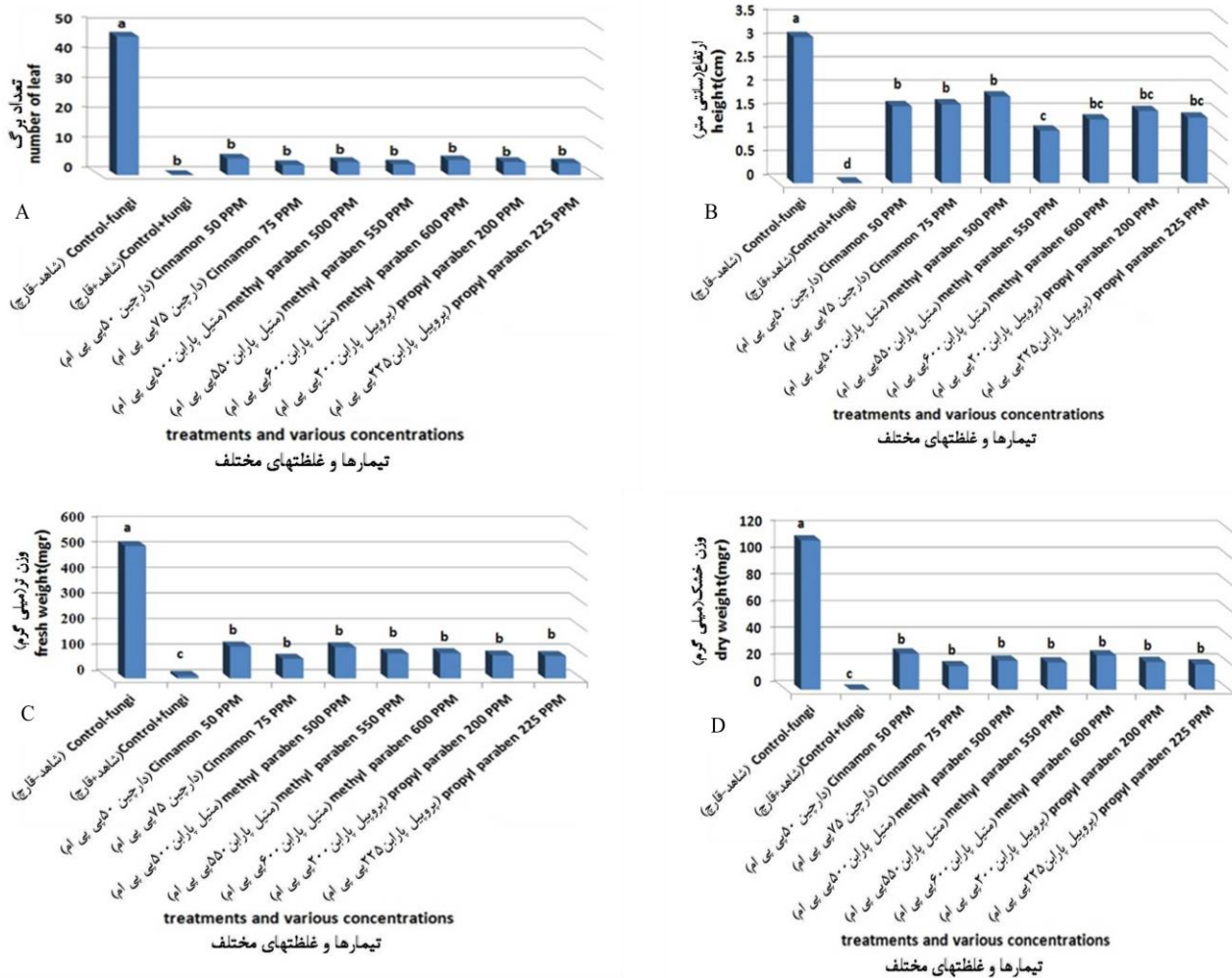
که در این غلظت ۸۵ درصد محیط استریل شده بود. در مورد اسانس دارچین اضافه شده به محیط‌کشت در غلظت ۳۶ میکرولیتر اسانس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت، اگرچه توانست ۱۰٪ درصد محیط‌کشت را استریل کند، اما در این غلظت وزن تر، طول شاخه‌ها، طول ریشه و همچنین تعداد گره‌های اندازه‌گیری شده به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت.

نتایج حاصل از آزمایشات ما نشان داد افزودن ترکیبات ضد قارچی به محیط‌کشت (اسانس و پارابن) باعث کاهش آلودگی محیط‌کشت می‌گردد. اگرچه رشد گیاه در تیمارهای حاوی ترکیبات ضدقارچ بسته به نوع ترکیب افزوده شده و غلظت آن، کاهش داشت، اما نسبت به تیمار شاهد همراه قارچ به‌طور معنی‌داری افزایش نشان می‌دهد که با نتایج دین و همکاران (2013) هم‌هنگ است. نتایج حاصل از آزمایشات ما در مورد اسانس اسطوخودوس و دارچین با نتایج دین و همکاران (2013) در مورد کاهش آلودگی مطابق است و در هر دو گزارش در غلظت‌های برابر اسانس دارچین و اسطوخودوس، اسانس دارچین نتیجه بهتری بر کاهش آلودگی داشته است.

اولین گزارش استفاده از اسانس‌های گیاهی در استریل محیط‌کشت بافت بدون اتوکلاو، توسط دین<sup>۱</sup> و همکاران (2013) روی محیط‌کشت گره‌های داودی منتشر شد. نتایج وی نشان داد کاربرد اسانس‌های ترنج<sup>۲</sup> با غلظت ۲۵۲ میکرولیتر اسانس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت، فلفل<sup>۳</sup> با غلظت ۱۸، زنجبیل<sup>۴</sup> با ۲۵۲، ریحان<sup>۵</sup> با ۱۰۸، اسطوخودوس<sup>۶</sup> ۱۰۸، لیموترش<sup>۷</sup> ۲۵۲، زردچوبه<sup>۸</sup> ۲۵۲، میخک<sup>۹</sup> ۱۸، دارچین ۳۶ و اسانس درخت چای<sup>۱۰</sup> با ۲۵۲ میکرولیتر اسانس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS، توانست ۱۰٪ محیط‌کشت بدون اتوکلاو را استریل کند، اما در این غلظت‌ها رشد گره‌های گیاه داودی بسیار کم یا فاقد هرگونه رشدی بود.

بهترین رشد گره‌های داودی روی محیط‌کشت اسانس فلفل (۹ میکرولیتر اسانس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت) و اسانس لیمو (۱۸۰ میکرولیتر اسانس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت) مشاهده شد که در این غلظت‌ها تنها ۹۰٪ محیط‌کشت استریل شده بود. سپس بهترین رشد در اسانس اسطوخودوس با غلظت ۳۶ میکرولیتر اسانس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مشاهده شد

1. Deein
2. *Citrus bergamia*
3. *Piper betle*
4. *Zingiber cassumunar*
5. *Ocimum sanctum*
6. *Lavandula angustifolia*
7. *Citrus limon*
8. *Curcuma longa*
9. *Eugenia caryophyllata*
10. *Tea tree oil*



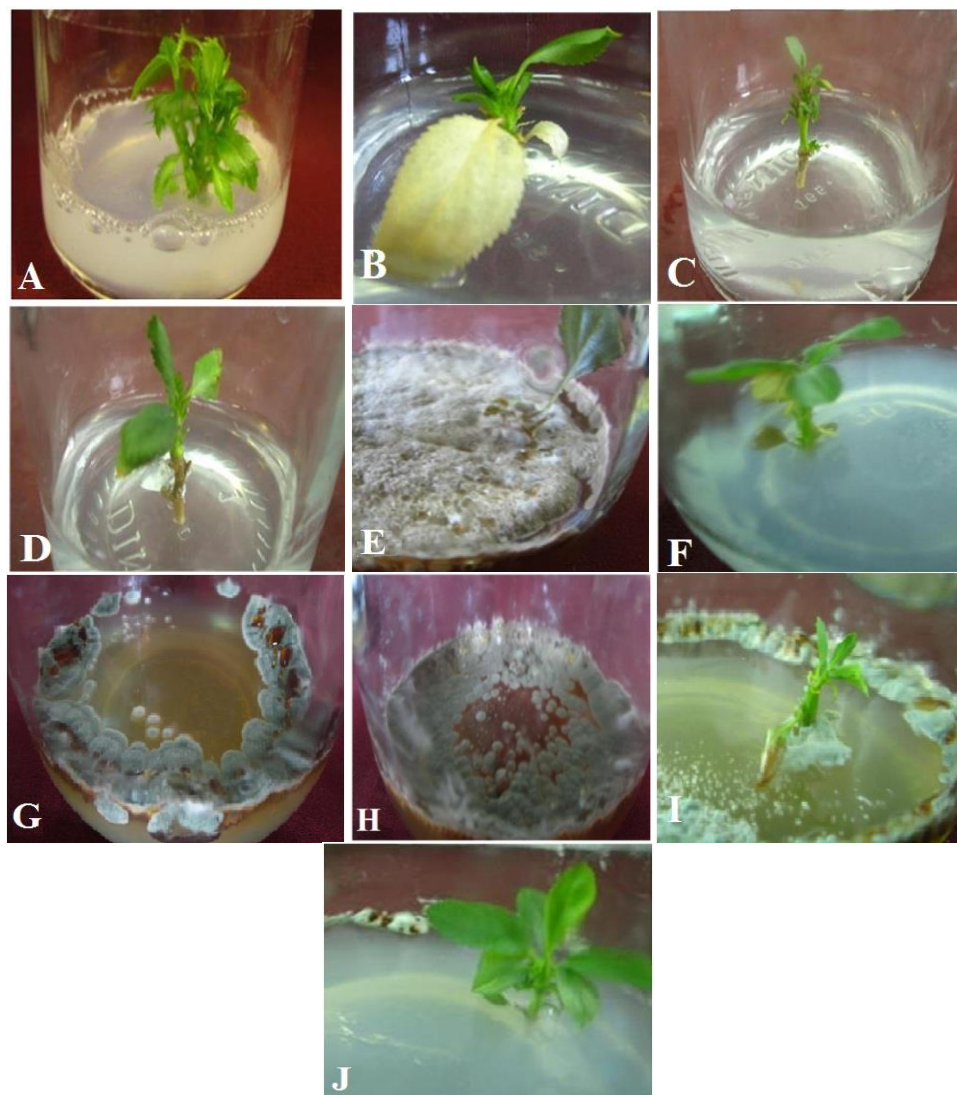
شکل ۴: اثر اسانس دارچین و پارابن‌ها به همراه قارچ پنی سیلیوم بر تعداد برگ، ارتفاع ساقه، وزن تر و وزن خشک گیاهچه

سیب رقم گالا

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱٪ می‌باشند.

Fig. 4: Effect of cinnamon essential oil and parabens with *Penicillium digitatum* fungi on leaf number, height, fresh weight and dry weight of apple plantlets cv. Gala

Mean having various followed letters are significantly different at 1% level



شکل ۵: تأثیر اسانس دارچین و متیل پارابن و پروپیل پارابن در غلظت‌های مختلف بر رشد قارچ پنی‌سیلیوم در گیاه سیب (A: تیمار شاهد به‌همراه گیاه و بدون قارچ، B: تیمار دارچین ۷۵ پی‌پی‌ام همراه گیاه و بدون قارچ، C: تیمار متیل پارابن ۶۰۰ پی‌پی‌ام همراه گیاه و بدون قارچ، D: پروپیل پارابن ۲۲۵ پی‌پی‌ام همراه گیاه و بدون قارچ، E: تیمار شاهد به‌همراه قارچ و گیاه، F: تیمار اسانس دارچین به‌همراه قارچ و گیاه، G: تیمار متیل پارابن ۶۰۰ پی‌پی‌ام همراه قارچ و بدون گیاه، H: تیمار پروپیل پارابن ۲۰۰ پی‌پی‌ام همراه قارچ و بدون گیاه، I: متیل پارابن ۵۵۰ پی‌پی‌ام به‌همراه قارچ و گیاه و J: پروپیل پارابن ۲۲۵ پی‌پی‌ام به‌همراه قارچ و گیاه)

Fig. 5: Effect of cinnamon essential oil, methyl paraben and propyl paraben in various concentration on growth *Penicillium digitatum* fungi in apple plantlets medium (A: control treatment with plant and without fungi, B: cinnamon essential oil 75 PPM with plant without fungi, C: methyl paraben 600 PPM with plant and without fungi, D: propyl paraben 200 PPM with plant and without fungi, E: control treatment with fungi and plant, F: cinnamon essential oil with fungi and plant, G: methyl paraben 600 PPM with fungi and without plant, H: propyl paraben 200 PPM with fungi and without plant, I: methyl paraben 550 PPM with fungi and plant and J: propyl paraben 225 PPM with fungi and plant)



## منابع

- الهی‌نیا، س. ع. ۱۳۷۲. قارچ شناسی و بیماری‌های گیاهی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه گیلان، رشت. ۲۷۰.
- سمیع، م. ا.، علیزاده، ع. ایزدی، ح. ۱۳۸۹. اثر برخی عصاره‌های گیاهی و آفت‌کش‌ها روی رشد مسیلیوم و تندش قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria bassiana* در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانش گیاهپزشکی ایران. دوره ۴۱، شماره ۲: ۳۳۶-۳۲۷.
- Antanov, A., Stewart, A. and Walter, M. 1997. Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cineria* by natural products. Proceedings of the 1997 New Zeland Plant Physiology Society Conference, <http://www.hortnet.co.nz/publications/nzpps/proceedings/97/97-159.html>.
- Bomar, M. 1962. Estimation of efficiency of fungitoxic compounds according to the inhibition of mycelium growth. *Folia Microbiologica*, 7: 185-190.
- Davidson, P., Juneja, V. and Branen, J. 2002. Antimicrobial Agents. Marcel dekker, Inc.
- Deein, W., 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*, 78: 1038-1041.
- El-Baroty, G. S., Abd El-Baky, H. H., Farag, R. S. and Saleh, M. A. 2010. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6): 167-174.
- Ghassan, J. K. and Rasha. A. A. 2008. *In Vitro* antifungal activities of various plant crude extracts and fractions against citrus post-harvest disease agent *Penicillium digitatum*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 89-99.
- Gill, A. O. and Holly, R. A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5750-5755.
- Guri, A. Z., Patel, K. N. 1998. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. *Plant Cell Technology*, United States Patent: 5750402.
- Hall, D. and Janeth fernandez, Y. 2004. *In Vitro* evaluation of selected essential oils as fungicides against *penicillium digitatum* sacc. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 117: 377-379.
- Inouye, S., Tsuruoka, M., Watanabe, M., Takeo, K., Akao, M., Nishiyama, Y. and Yamaguchi, H. 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43: 17-23.
- Lahooji, A., Mirabolfathi, M. and Karami-osboo, R. 2010. Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils thymol and carvacrol on growth of *Fusarium gramineum* Isolates and deoxyxyniv alenol production. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46: 11-13.
- Leifert, C., and Cassells, A. C. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *Society for In Vitro*, 37: 133-138.
- Marino, G. and Gaggia, F. 2009. Elimination of *In Vitro* bacterial contaminants in shoot cultures of 'MRS 2/5' plum hybrid by the use of *Melia azedarach* extracts. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 195-205.
- Naeini, A., Khosravi, A. R., Chitsaz, M., Shokri, H. and Kamlnjad, M. 2009. Anti-*Candida albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *Journal de Mycologie Médicale*, 19: 168-172.
- Nakagawa, Y. and Moldeus, P. 1998. Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 55: 1907-1914.
- Nes, I. F. and Eklund, T. 1983. The effects of paraben on DNA, RNA and protein-synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54: 237-242.
- Omamor, I. B., Asemota, A. O., Eke, C. R. and Eziashi E. I. 2007. Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian institute for oil palm research (NIFOR). *African Journal of Agricultural*, 2(10): 534-537.
- Onkar, D. and James B. 1995. Basic plant pathology methods. Second Edition. CRC Lewis publishers. USA.
- Ouyang, J., Wang, X. D., Zhao, B. and Wang, Y. C. 2003. Effect of Ag-carrying Zirconium Phosphate on the Kinetics of growth of the roots of culture *artemisia annua*. *Acta Botanica Sinica*, 45(2): 136-139.
- Pengfei, L., Junxing, Z. and Shaobo, L. 2013. Effects of natamycin on the elimination of fungal contamination in rice and *Arabidopsis thaliana* tissue cultures for Agrobacterium-mediated transformation. *Research Journal of Biotechnology*, 8(8): 3-9
- Rasooli, I and Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemist*, 66: 2851-2856.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M., Jaimand, K., Alinezad, S., Saberi, R. and Yoshinari, T. 2009. Chemical composition and anti-aflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, 20: 1018-1024.
- Reddy, M. V. B., Angers, P., Gosselin, A. and Arul, J. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47: 1515-1520.
- Saad, B., Bari, F. and Saleh, M. I. 2005. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1073: 393-397.

- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Ppolissiu, M., Sokmen, M. and Sahin, F. 2004. The *In Vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15: 627-634.
- Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L. and Greenberg, N. A. 2001. Safety assessment of propyl-paraben: a review of the published literature. *Food Chemical Toxicology*, 39: 513-532.
- Valkova, N., Lepine, F. and Valeanu, L. 2001. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. *Applied and environmental microbiology*, 67(6): 2404-2409.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez, J. A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27: 91-101.
- Wang, S. Y., Chen, P. F. and Chag, S. T. 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 96: 813-818.
- Watanabe, K. and Takesue, S. 1976. Selective inhibition of germination of *Bacillus megaterium* spores by alkyl p-hydroxybenzoates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 24: 224-229.
- Xing, Y., Xihong, Li., Qinglian, Xu., Juan, Yun. and Yaqing, Lu. 2010. Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International Journal of Food Science and Technology*, 1837-1842.
- Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R. and Taheri, H. 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1445-1450.

## Antifungal Activity of Several Essential Oils of Medicinal Plants and Two Parabens on Apple (*Malus domestica* cv. Gala) *In Vitro* Culture

Ghazi Motlagh<sup>1\*</sup>, S. Z., Tehranifar<sup>2</sup>, A., Arouie<sup>3</sup>, H. and Jahanbakhsh<sup>4</sup>, V.

### Abstract

Contamination in tissue culture is a common problem that induces the elimination of some or whole explants in tissue culture medium. The aim of this study was to eliminate or decreasing the contamination in tissue culture. In stage one, for determination of the best anti-fungi material and suitable concentration for spore germination inhibitory of *Penicillium digitatum*, inhibitory spore germination pre-test on MS medium was examined. Result showed that the best treatments for spore germination inhibitory were cinnamon essential oil with 50 and 75 ppm and methyl and propyl paraben at concentration of 600 and 225 ppm. In stage two, hyphe growth of *Penicillium digitatum* in selected treatment was evaluated. Result emphasis that in the selected treatment, spore germination was inhibited better than hyphe growth. The highest and lowest hyphe growth was related to cinnamon essential oil and methyl paraben treatment. In stage three, apple plantlets with essential oil and paraben in various concentrations were cultured on MS medium. Result showed that in the whole treatment, increasing the concentration of anti-fungal materials reduced growth properties of plants. The best growth of apple plantlets was observed in cinnamon essential oils. In stage four, the effect of paraben and essential oils with spore of *Penicillium digitatum* in MS medium on growth of plantlets was evaluated. Result showed that although methyl and propyl paraben at concentration of 600 and 225 ppm controlled spore germination very well but contamination in MS medium appeared. Therefore, the best treatment was cinnamon essential oil at concentration of 50 and 75 ppm.

**Keywords:** Cinnamon Essential oil, Paraben, Spore germination, Hyphe growth, Apple plantlets

---

1. Graguated Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

2. Professor, Permanent member Department of Ornamental Plants, Research centre of plant Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

3. Assistant professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

4. Assistant professor, Department of Plant Protection, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad

※: Corresponding Author      Email: ze\_gh12@yahoo.com