

مقایسه عملکرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با یک پیتید نو ترکیب در کنترل عوامل مهم بیماری‌زای قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید

فرج الله شهریاری^{۱*} - عباس تنهائیان^۲ - مهدی اخلاقی^۳ - نرگس نظیفی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۷

چکیده

در پژوهش حاضر اسانس گیاهان زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و دو عصاره‌ی ایتانولی گیاهان کندل (*Dorema ammoniacum*) و چویل (*Ferulago angulata*) در مقایسه با یک پیتید نو ترکیب کایمیری (لاکتوفرین-لاکتوفرامپین) که از مهمترین اجزا ضد میکروبی شیر شتر می‌باشد جهت مهار عوامل بیماری‌زای قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید، شامل باکتری *Pseudomonas tolaasii* و قارچ *Trichoderma harzianum* مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسانس‌گیری با استفاده از کلونجر و عصاره‌ها با استفاده حلال متانول ۸۰ درصد و با روش خیساندن بدست آمد. پیتید نو ترکیب کایمیری از سلول‌های کلیه جنین انسان (HEK 293) استحصال شد. خصوصیات ضد باکتریایی و قارچی ترکیبات مورد آزمایش به ترتیب با استفاده از روش دیسک و اختلاط با محیط کشت بررسی گردید. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی برای باکتری (MBC) و قارچ (MFC) محاسبه شد. تمام آزمایش‌ها با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت. نتایج ارزیابی‌های ضد باکتریایی نشان داد که پیتید کایمیری، در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین عملکرد را با میانگین قطر هاله بازدارنده ۳۲/۲ میلی‌متر در بین ترکیبات مورد بررسی داشت و بعد از آن اسانس زیره سبز و عصاره کندل به ترتیب با هفت و شش میلی‌متر دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بودند. نتیجه اثرات ضد قارچی ترکیبات مورد آزمایش در مدت زمان هفت روز نشان داد که اسانس‌های گیاهان زیره سبز و آویشن شیرازی بطور کامل از رشد قارچ *T. harzianum* جلوگیری کردند و بعد از آن عصاره گیاهان کندل و چویل با میانگین رشد کُلنی قارچ به میزان ۲۶ و ۶۰/۶۶ میلی‌متر بیشترین اثر ضد قارچی را دارا بودند. کمترین اثر ضد قارچی در مورد پیتید نو ترکیب کایمیری بدست آمد. با توجه به نتایج این پژوهش، پیتید کایمیری اثرات ضد باکتریایی بیشتری در مقایسه با اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارا بود و در مقابل اسانس‌ها و عصاره‌ها در مقایسه با پیتید مورد آزمایش از توان ضد قارچی بیشتری برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: اثر ضد میکروبی، پیتید ضد میکروبی، *Trichoderma harzianum*، *Pseudomonas tolaasii*

مقدمه

شده است که قارچ خوراکی تکمه‌ای از مناسب‌ترین گزینه‌ها جهت تکمیل سبد غذایی انسان به شمار آید (۲۷ و ۳۷)، در نتیجه تلاش برای توسعه کشت و کاهش هزینه‌های تولید از طریق مهار عوامل بیمارگر این محصول، امری ارزشمند محسوب می‌شود (۲). کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی از اهداف همیشگی در تأمین امنیت غذایی به شمار می‌آید که رایج‌ترین راهکار استفاده از سموم شیمیایی است ولی عوارض نامطلوب سموم شیمیایی انکارناپذیر است و مطالعات متعددی حاکی از تأثیرات ناخواسته و نامناسب به کارگیری سموم کشاورزی بر محیط زیست و سلامت انسان می‌باشد (۵ و ۱۱). از طرفی با توجه به نوع مصرف قارچ خوراکی توجه به ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی اجتناب‌ناپذیر است. از نوین‌ترین جایگزین‌های سموم و ترکیبات شیمیایی، به کارگیری ترکیبات بدست آمده از طبیعت مانند

قارچ خوراکی به عنوان منبع غنی از پروتئین دارای جایگاه ویژه‌ای در بین مواد غذایی می‌باشد و قادر به تولید بیشترین مقدار پروتئین در واحد سطح نسبت به اکثریت مواد غذایی می‌باشد (۳۱). مقادیر قابل توجه‌ای از ویتامین‌ها، اسیدفولیک و مواد معدنی سبب

۱ و ۲- استاد و دانش آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: (Email: Shahriari@um.ac.ir)

۳- دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

حاضر به بررسی آثار مهارکنندگی ترکیبات فوق علیه *P. tolaasii* و *T. harzianum* به عنوان مهمترین بیمارگرهای قارچ خوراکی تکمهای سفید پرداخته شد. در این پژوهش، ارزیابی‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی اسانس گیاهان زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و عصاره گیاهان کندل (*Dorema ammoniacum*)، چویل (*Ferulago angulata*) و پیتید کایمری نوترکیب بر روی دو بیمارگر مهم قارچ خوراکی صورت گرفت و نتایج این پژوهش چشم‌انداز نوید بخشی از کاربرد ترکیبات جایگزین سموم در شرایط آزمایشگاهی را در اختیار ما قرار داد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

گیاهان از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شدند. در ادامه شستشوی سطحی بافت‌های گیاهی توسط آب مقطر سترون انجام شد و گیاهان در شرایط استاندارد (دمای اتاق و سایه) خشک شدند. سپس از قسمت‌های مختلف گیاهان برای تهیه اسانس و عصاره استفاده بعمل آمد (جدول ۱) (۱۰).

فرآیند اسانس‌گیری و عصاره‌گیری

۱۰۰ گرم از بافت گیاهی خرد و سپس توسط دستگاه کلونجر از طریق فرآیند تقطیر به مدت ۳ ساعت استخراج و نهایتاً اسانس به دست آمده به وسیله سولفات سدیم (Na_2SO_4) آب‌گیری و در شیشه‌های تیره سترون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۴). جهت تهیه عصاره گیاهی پس از خشک کردن قسمت‌های مختلف گیاهان به آنها اتانول ۸۰٪ و آب مقطر (با نسبت ۱ به ۶ پودر به حلال) اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت به آرامی بر روی دستگاه دورانی (با تکان ۵۰ دور در دقیقه) جهت استخراج ترکیبات قرار داده شد. سپس مخلوطی از حلال و گیاه، با استفاده از کاغذ صافی واتمن (شماره ۴۱)، فیلتر شده و عصاره اولیه به دست آمد. ماده باقی مانده برای جدا کردن حلال در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد درون دستگاه روتاری^۲ قرار گرفت تا به صورت کامل خشک گردید. پس از خشک شدن کامل، پودر عصاره‌ها در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۳۲).

اسانس‌ها، عصاره‌های گیاهی و همچنین پپتیدهای ضد میکروبی^۱ (AMPs) موجود در سایر جانداران می‌باشد (۱، ۴ و ۱۷). در حال حاضر جستجو برای یافتن ترکیبات مفید از گیاهان دارویی در کنترل بیماری‌های گیاهی، توجه زیادی را به خود جلب کرده و شامل طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، کونینون‌ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و ترپنوئیدها می‌باشند. از این رو مطالعات گسترده‌ای در مورد کاربرد این گروه از ترکیبات در مهار عوامل بیماری‌زای گیاهی انجام شده است (۲۲ و ۳۸). پژوهش‌های متعدد حاکی از پتانسیل بالای عصاره‌های گیاهی در مهار طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌های انسانی، جانوری و گیاهی است که با توجه به مشکلات زیست محیطی سموم، به عنوان جایگزین قابل اعتماد محسوب می‌شوند (۳۳). به کارگیری پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) برای مهار عوامل بیماری‌زای گیاهی یکی دیگر از راهکارهای نوین جهت جایگزینی سموم شیمیایی است (۱۲). این پپتیدها به طور طبیعی در آرگانسیم‌های مختلف شامل از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها تا گونه‌های گیاهی و جانوری یافت می‌شوند (۷، ۸). کمبود این پپتید در منابع طبیعی همراه با هزینه‌های استخراج و تخلیص، محققین را به تلاش برای جایگزینی فن‌آوری DNA نوترکیب برای دستیابی به این محصولات ارزشمند زیستی هدایت کرده است. به لطف پیشرفت در مهندسی ژنتیک، پپتیدهای ضد میکروبی را می‌توان در مقایسه با منابع طبیعی و ساخت بیوشیمیایی در مقیاس صنعتی با هزینه‌ای قابل قبول تولید نمود (۲۹). لاکتوفرین (*Lactoferricin*) و لاکتوفرامپین (*Lactoferrampin*) دو پپتید ضد میکروبی هستند که مهمترین اجزا لاکتوفرین (*Lactoferrin*) شیر به شمار می‌روند. لاکتوفرین به عنوان گلیکوپروتئین (۸۰ کیلو دالتون) اتصال دهنده آهن شناخته شده است که در ترشحات غلیظ، شیر، ترشحات مخاطی و دستگاه گوارش وجود دارد (۱۹، ۲۰). مطالعات قبلی نشان داده است که اثر ضد میکروبی پپتید کایمری لاکتوفرین به همراه لاکتوفرامپین قوی‌تر از اثر هر یک به تنهایی می‌باشد (۴۲). قارچ تکمهای *Agaricus bisporus* Imbach (Lange) که به عنوان یک محصول مهم در کشاورزی محسوب می‌شود و نسبت به عوامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی نظیر *Pseudomonas tolaasii* عامل بیماری لکه قهوه‌ای و *Trichoderma harzianum* عامل بیماری کپک سبز، بسیار حساس می‌باشد. بیمارگرهای فوق عامل کاهش کمی و کیفی این محصول ارزشمند غذایی هستند (۴۱). از طرف دیگر استفاده از سموم شیمیایی در مهار عوامل بیمارگر، برخی از عوارض جانبی مانند باقی ماندن این مواد در قارچ خوراکی را در پی دارد (۳۵). با در نظر گرفتن آثار بالقوه اسانس‌ها، عصاره گیاهی و پپتیدهای ضد میکروبی، در پژوهش

جدول ۱- مشخصات گیاهان استفاده شده در این پژوهش

Table 1- Characteristics of plants used in this research

ردیف No	نام گیاه Plant	نوع ترکیب Combination type	نام علمی Scientific name	خانواده Family	اندام مورد استفاده Plant part used	منطقه جمع‌آوری (استان) Collecting area (Province)
1	آویشن شیرازی Shirazi thyme	اسانس Essential oil	<i>Zataria multiflora</i>	Lamiaceae	برگ Leaves	فارس Fars
2	زیره سبز Cumin	اسانس Essential oil	<i>Cuminum cyminum</i>	Apiaceae	بذر Seed	سمنان Semenan
3	کندل Ammoniacum	عصاره Plant extract	<i>Dorema ammoniacum</i>	Apiaceae	برگ / ساقه Leaves / stems	خراسان رضوی Razavi Khorasan
4	چویل Ferulago	عصاره Plant extract	<i>Ferulago angulata</i>	Apiaceae	برگ / ساقه Leaves / stems	کهگیلویه و بویراحمد Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad

ترانسفکت شده با وکتور بیانی دارنده سیگنال ترشحی (+3.1 Pcdna) و حاوی توالی کدکننده کایمر نو ترکیب بودند، استفاده گردید. بدین منظور ابتدا این لاین سلولی ترانسفکت شده را کشت و سپس اقدام به جمع‌آوری محیط کشت حاوی پپتید نو ترکیب نموده و از آن برای آزمون ضد میکروبی استفاده گردید. سلول‌های HEK 293 ترانسفکت شده در محیط کشت DMEM (سیگما آلدریج، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم (calf serum Fetal FCS، شرکت Gibco، آمریکا)، ۱ درصد از مخلوط آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومیسین (P/S شرکت Gibco، آمریکا) و در شرایط انکوباتور دی‌اکسید کربن دار (۵ درصد CO₂) دارای رطوبت ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و سپس محیط کشت حاوی پپتید نو ترکیب جمع‌آوری و برای ارزیابی‌های ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت (۴۲ و ۳۶).

بررسی اثر ضد باکتریایی ترکیبات مورد آزمایش

باکتری *P. tolaasii* در محیط LB مایع در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت رشد داده شد. در ادامه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت 1×10^8 CFU/ml^۱ در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار^۲ (کیوب، مونترال، کانادا) ۲۲ گرم در لیتر) به صورت یکنواخت پخش شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه سطح محیط خشک گردید. سپس در سطح محیط از دیسک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر (شرکت طب آزما) که به فاصله ۳ سانتی‌متری از یکدیگر قرار گرفته بودند استفاده شد. مقادیر ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر (معادل غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اسانس‌ها و عصاره‌های مورد آزمایش) و چهار غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتید نو ترکیب بر روی هر دیسک قرار داده شد.

تهیه عوامل بیماری‌زای باکتریایی و قارچی و شرایط رشد

جدایه استاندارد باکتری *Pseudomonas tolaasii* CH36 و جدایه قارچی *Trichoderma harzianum* به ترتیب از گروه بیوتکنولوژی و به نژادی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و مرکز جهاد دانشگاهی دانشگاه فردوسی مشهد (ACECR) تهیه گردید. به منظور کشت تازه باکتری از جدایه‌ی نگهداری شده در فریزر، ۳۰ میکرولیتر از جدایه مورد نظر درون ۳ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا- برانتی مایع^۱ (LB) (لیوفلیکم، ترآمو، ایتالیا/ ۲۵ گرم در لیتر) انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه دورانی (با تکان ۱۰۰ دور در دقیقه) انکوبه گردید. پس از رشد جدایه مورد نظر به صورت چمنی بر روی محیط کشت^۲ KB (مرک، آلمان، ۳۳ گرم در لیتر) کشت داده شد (۲). همچنین جهت استفاده از قارچ پس از کشت مجدد در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار^۳ (PDA) (لیوفلیکم، ترآمو، ایتالیا/ ۳۹ گرم در لیتر) و رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت از نواحی حاوی هیف تازه جهت ادامه آزمایش‌ها استفاده به عمل آمد (۴).

آماده‌سازی پپتید نو ترکیب کایمری لاکتوفرین-لاکتوفرامپین

با توجه به اینکه این مطالعه در ادامه پژوهش دیگری در زمینه سنتز پپتید نو ترکیب ضد میکروبی در گروه بیوتکنولوژی گیاهی و به نژادی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بود، لذا از سکوی تولید این پپتید که طی آن سلول‌های کلیه جنین انسان (HEK 293)

1- Luria-Bertani broth
2- King's B
3- Potato Dextrose Agar

4- Muller-Hinton Agar

که توانسته ۹۹/۹ درصد از باکتری‌ها را نابود کند (با کشت دادن بر روی محیط NA)، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید (۹).

آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای قارچ

Trichoderma harzianum

در ابتدا غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هر یک از ترکیبات مورد آزمایش تهیه گردید. پس از آماده‌سازی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA و پس از رسیدن به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد غلظت‌های مختلف ترکیبات مورد آزمایش به آنها اضافه گردید. یک پتری به عنوان شاهد مثبت (بدون ترکیبات مورد آزمایش) و یک پتری حاوی محیط کشت و دی متیل سولفوکساید یک درصد به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. در ادامه قطعات مساوی از قارچ بر روی محیط کشت قرار گرفت، پتری‌ها در دمای ۲۵ به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. پتری‌ها از نظر گسترش کلنی قارچ یا عدم رشد مورد ارزیابی قرار گرفتند. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) شامل غلظتی است که در آن کاهش رشد قارچ نسبت به شاهد مثبت مشهود بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی (MFC) قارچ شامل غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش بود که طی سه روز انکوباسیون هیچ گونه رشد قارچ، نسبت به شاهد مثبت مشاهده نگردید. کلیه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید (۳۵).

آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها برای پارمترهای مورد مطالعه از نرم‌افزار Minitab (version 15) استفاده شد. برای مقایسه مقادیر ناحیه بازدارنده تیمارهای مورد بررسی از روش Fisher LSD با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel (2013) استفاده بعمل آمد.

نتایج

۱- نتایج اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی

علیه باکتری *P. tolaasii*

اسانس گیاه زیره سبز (*C. cyminum*) و عصاره گیاه کندل (*D. ammoniacum*) هر یک با ایجاد هاله بازدارنده به قطر هفت میلی‌متر (از لبه دیسک) در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیشترین اثر ضد باکتریایی را نشان دادند، در حالی که اسانس گیاه آویشن شیرازی (*Z. multiflora*) و چویل (*F. angulata*) با هاله بازدارنده دو و یک میلی‌متری اثر ضد باکتریایی کمتری را از خود بروز دادند.

برای شاهد منفی آزمایش از محلول دی متیل سولفوکساید^۱ (DMSO) یک درصد استفاده شد (۴۱).

ارزیابی میزان اثر ضد قارچی ترکیبات مورد آزمایش

اثر ضد قارچی با روش اختلاط با محیط کشت PDA مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر یک از ترکیبات مورد آزمایش به ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA اضافه شد و در ادامه درون پتری ۸ سانتیمتری توزیع گردید. جهت بررسی اثر ضد قارچی پیتید پتری از پنج غلظت ۳۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پیتید استفاده شد. قطعات هم اندازه (۳ تا ۴ میلی‌متر) قارچ *T. harzianum* در وسط هر پتری بر روی محیط کشت قرار گرفت. پتری تلقیح شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. با گذشت ۲۴ ساعت و رشد قارچ، قطر کلنی برای ۷ روز متوالی اندازه‌گیری و با شاهد (محیط کشت فاقد ترکیبات مورد آزمایش) مقایسه گردید (۳۴).

آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی باکتری

Pseudomonas tolaasii

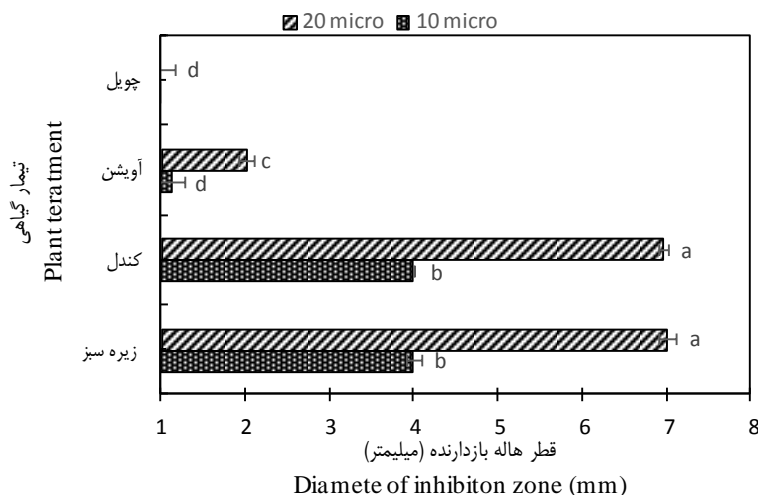
بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون مایع (کیولب) به هر چاهک میکروپلیت اضافه گردید. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر از پیتید، اسانس و عصاره اضافه و از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک یازدهم رقیق شد (غلظت‌های هر چاهک به ترتیب ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸۱، ۳/۹۰، ۱/۹۵ و ۰/۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد). در انتها به همه چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل 5×10^5 CFU/ml اضافه شد. چاهک شماره ۱۱ هر ردیف به عنوان کنترل منفی، فقط حاوی محیط کشت، و ترکیبات مورد استفاده (بدون حضور باکتری) و چاهک شماره ۱۲ هر ردیف نیز به عنوان کنترل مثبت که شامل محیط کشت، دی متیل سولفوکساید یک درصد و باکتری بود. بعد از تلقیح باکتری، میکروپلیت بر روی دستگاه دورانی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. بعد از اتمام انکوباسیون، کدورت یا عدم کدورت در چاهک به صورت چشمی مشاهده و جذب نوری توسط دستگاه خوانش گر الیزا (STAT FAX 2100) در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید. برای تعیین MIC از کمترین غلظتی که فاقد هرگونه کدورت بود استفاده شد. جهت اندازه‌گیری MBC، از چاهک‌های فاقد کدورت مقدار ۵ میکرولیتر بر روی محیط آگار غذایی^۲ (NA) کشت داده شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کمترین رقتی

1- Dimethyl sulfoxide (DMSO)

2- Nutrient agar (NA)

تیمارها از حداقل اثر ضد باکتریایی برخوردار بود در حالی که استفاده از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مورد اسانس آویشن و عصاره چویل فاقد هر گونه اثر ضد باکتریایی بود و می‌توان اظهار داشت که دو ترکیب گیاهی فوق در غلظت‌های به کار برده شده فاقد اثر ضد میکروبی مؤثر بودند. در نتیجه باید بیان داشت، افزایش قدرت ضد باکتریایی ترکیبات مورد بررسی با افزایش غلظت ترکیبات مورد استفاده از یک ارتباط مستقیم بهره‌مند بود.

(شکل ۱- جدول ۲). مقایسه بین دو غلظت تیمارهای مورد آزمایش نشان داد، میانگین قطر هاله بازدارنده (سه تکرار برای هر تیمار در دو غلظت مختلف) در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با میانگین تقریبی ۳ میلی‌متر به طور معنی‌داری عملکرد بهتری نسبت به غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با میانگین ۱/۵ میلی‌متر دارا بود. همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای گیاهی با غلظت آنها نشان داد که استفاده از غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در مورد تمامی



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای گیاهی در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *P. tolaasii*
Figure 1- Mean comparison of the interaction effects between two concentrations of plant treatments (10 and 20 µg/ml) against *P. tolaasii*

جدول ۲- قطر هاله بازدارنده در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه *P. tolaasii* بر حسب میلی‌متر
Table 2 -The diameter of the inhibition zone (mm) in the two concentrations 10 and 20 µg/ml used against *P. tolaasii*

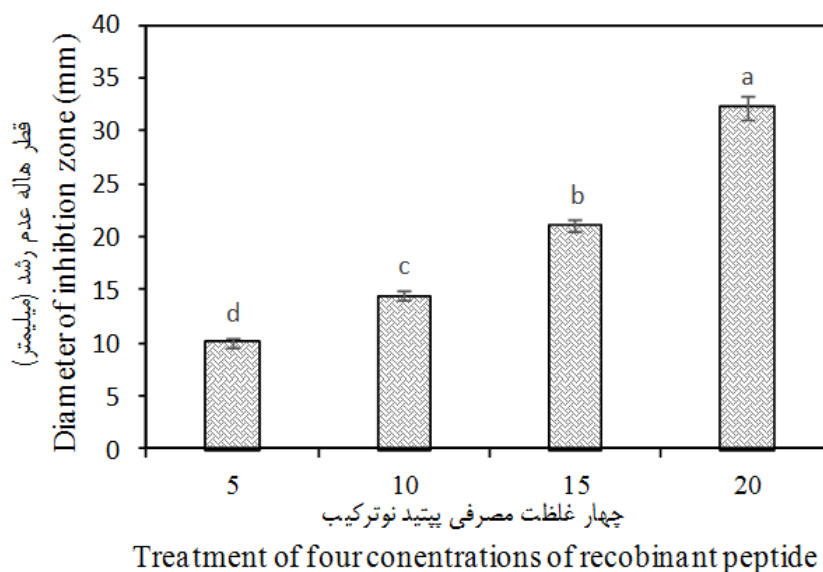
ردیف NO.	تیمار Treatment	غلظت Concentration	
		10 µg/ml	20 µg/ml
1	زیره سبز <i>Cuminum cyminum</i>	4	7
2	کندل <i>Dorema ammoniacum</i>	4	7
3	آویشن <i>Zataria multiflora</i>	1	2
4	چویل <i>Ferulago angulata</i>	0	1

در هر چهار غلظت بکار برده شده از توان ضد میکروبی برخوردار بود. بیشترین میانگین قطر هاله بازدارنده علیه باکتری *P. tolaasii* مربوط به استفاده از غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین عملکرد در

۲- نتایج اثر پتید نو ترکیب کایمری ضد باکتری *P. tolaasii*
نتایج اثر ضد میکروبی پتید کایمری مورد آزمایش نشان داد که

مؤثرتر ارزیابی شد (جدول ۲). میانگین نتایج قطر هاله بازدارنده در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، به ترتیب ۱۰/۳، ۱۴/۶۳ و ۲۱/۰۶ میلی‌متر بدست آمد. با مقایسه غلظت‌ها مشخص شد که یک ارتباط مستقیم بین غلظت پپتید نو ترکیب و افزایش قدرت ضد باکتریایی وجود دارد.

غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. تجزیه واریانس آماری نشان داد که اختلاف آماری معنی‌دار بین چهار غلظت ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ پپتید کایمری ($P < 0/0001$ و $M: 57.79$, $DF: 4$) وجود داشت (شکل ۲). در مقایسه با ترکیبات گیاهی مورد آزمایش پپتید نو ترکیب در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با میانگین هاله بازدارنده ۳۲/۲ میلی‌متر از دو اسانس آویشن شیرازی، زیره سبز و دو عصاره کندل و چویل در کنترل باکتری عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی



شکل ۲- نتایج قطر هاله بازدارنده بر روی باکتری *P. tolaasii* در چهار غلظت مختلف از پپتید کایمری برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر
Figure 2- The results of the inhibition zone on *P. tolaasii* bacteria in four different concentrations of chimeric peptide (µg/ml)

ترکیبات مورد آزمایش در جلوگیری از رشد قارچ، از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/0001$). مقایسه میانگین نتایج نشان داد که اسانس گیاهان زیره سبز و آویشن با جلوگیری کامل از رشد قارچ از توانایی بسیار مطلوبی در کنترل قارچ برخوردار بودند. گسترش کلنی قارچ *T. harzianum* در محیط کشت شاهد (فاقد ترکیبات مورد آزمایش) در مدت زمان پنج روز کامل گردید (۷۰ میلی‌متر). تیمار حاوی عصاره کندل با رشد کلنی به میزان ۲۶ میلی‌متر (در مدت زمان هفت روز) در جایگاه بعدی قرار گرفت. اما عصاره چویل با رشد کلنی قارچ به میزان ۶۵/۱۷ میلی‌متر در مدت زمان هفت روز کمترین اثر را در بین ترکیبات به کار برده شده نشان داد. نتایج بیانگر این نکته بود که اسانس‌ها نسبت به عصاره‌ها از قدرت ضد قارچی بیشتری علیه قارچ *T. harzianum* برخوردار بودند (جدول ۴).

۳- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کُشنندگی ترکیبات

مورد بررسی علیه باکتری *P. tolaasii*

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) فعالیت باکتری برای تیمارهای پپتید نو ترکیب، اسانس زیره سبز و عصاره گیاه کندل به ترتیب ۷/۸۱، ۳۱/۲ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد (جدول ۳). همچنین نتایج نشان داد کمترین MIC مربوط به عصاره چویل می‌باشد (جدول ۳). مقادیر MIC و MBC عصاره کندل و اسانس آویشن به صورت یکسان بدست آمد. همچنین حداقل غلظت کُشنندگی (MBC) ترکیبات فوق به ترتیب ۱۵/۶، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد گردید. سایر نتایج در شکل جدول ۳ نشان داده شده است.

۴- بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس اثر ضد قارچی ترکیبات مورد آزمایش بر میزان رشد قارچ *T. harzianum* نشان داد، بکارگیری

جدول ۳- نتایج MIC و MBC برای باکتری تحت تیمارهای گوناگون
Table 3- MIC and MBC results for bacteria under various treatments

ردیف NO.	تیمارهای گیاهی و پپتید Plant treatment and Peptide	<i>P. tolaasii</i>	
		MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
1	پپتید کایمری Chimeric peptide	7.81	15.6
2	زیره سبز <i>Cuminum cyminum</i>	31.2	62.5
3	کندل <i>Dorema ammoniacum</i>	62.5	125
4	آویشن <i>Zataria multiflora</i>	62.5	125
5	چویل <i>Ferulago angulata</i>	125	250

جدول ۴- میزان رشد کلنی قارچ در مدت زمان یک هفته تحت تیمارهای مورد آزمایش به میلی متر
Table 4- The growth rate of the fungal colony in the weekly period of the treated treatments (mm)

ردیف No	تیمار Treatment	روز Day						
		1	2	3	4	5	6	7
1	زیره سبز <i>Cuminum cyminum</i>	0	0	0	0	0	0	0
2	آویشن <i>Zataria multiflora</i>	0	0	0	0	0	0	0
3	کندل <i>Dorema ammoniacum</i>	0	7	9	14	17	20	26
4	چویل <i>Ferulago angulata</i>	8	23	30	38	46	55	60
5	شاهد (محیط کشت) Control (Medium)	9	21	57	64	70	70	70

میکروگرم بر میلی لیتر تفاوت معنی داری در جلوگیری از رشد با کنترل مشاهده نگردید (جدول ۵). همچنین نتایج مقایسه اثر پپتید کایمری، اسانس‌ها و عصاره‌ها در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر در جدول شماره ۶ نشان داده شده است.

۵- نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بر ضد قارچ *T. harzianum*

نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MFC) برای قارچ بیمارگر *T. harzianum* نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) برای پپتید کایمری، عصاره کندل و چویل در این پژوهش به ترتیب ۱۲۵، ۶۵/۵ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (جدول ۷- شکل ۳). نتایج حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره چویل و کندل نیز ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. سایر نتایج در جدول ۷ نشان داده شده است.

بررسی اثر ضد قارچی پپتید کایمری

نتایج فعالیت ضد میکروبی پپتید کایمری نو ترکیب در جدول ۵ نشان داده شده است. بیشترین اثر ضد قارچی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. با توجه به مقایسه میانگین، با افزایش غلظت پپتید تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، قطر رشدی پرگنه قارچ *T. harzianum* به طور معنی داری کاهش پیدا کرد. با این حال، تفاوت معنی داری بین غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر و شاهد (محیط کشت بدون پپتید کایمری) وجود نداشت. همچنین بین استفاده از غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. به طور کلی می توان بیان داشت که در غلظت‌های بیشتر، پپتید کایمری نقش ضد قارچی بهتری از خود نشان داد (جدول ۵). با توجه به نتایج تجزیه واریانس، در غلظت‌های ۸۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، پپتید کایمری اثر قابل توجهی بر کنترل قارچ داشت ($P < 0.0001$)، اما در غلظت ۳۰

جدول ۵- نتایج تأثیر پپتید کایمری بر روی پیشرفت کلنی قارچ در پنج غلظت مختلف

Table 5- Results of the effect of peptide on fungi at four concentrations

ردیف No	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر) Concentration (µg/ml)	نرخ رشد کلنی قارچ (میلی متر) Fungal colony growth rate (mm)
1	Control	70.43 ^A
2	30	69.17 ^A
3	40	68.21 ^{AB}
4	80	64.66 ^C
5	160	61.67 ^{CD}
6	200	59.71 ^D

جدول ۶- مقایسه اثر ترکیبات در غلظت های ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر در مدت ۷ روز بر قارچ *T. harzianum*

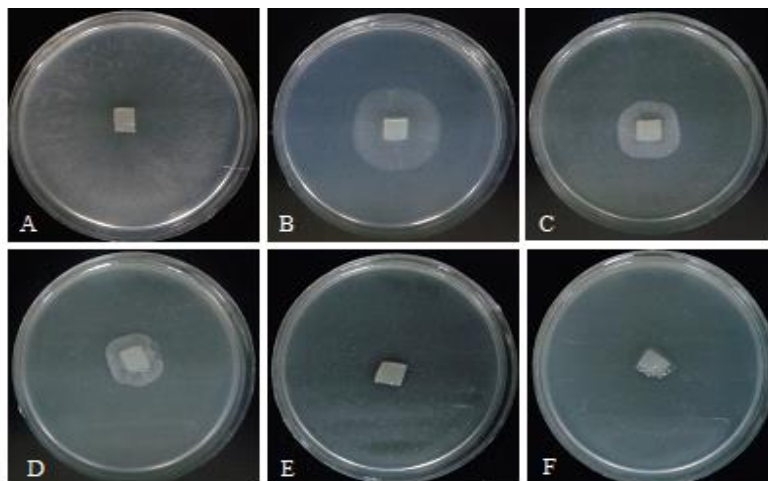
Table 6- Comparison of the effect of compounds in concentration of 30 µg/ml for 7 days on *T. harzianum*

ردیف No.	تیمارها Treatments	قطر کلنی قارچ (میلی متر) Fungi colony diameter (mm)
1	شاهد Control	70.33 ^A
2	پپتید کایمری Chimeric peptide	69.17 ^A
3	چویل <i>Ferulago angulata</i>	60.66 ^B
4	کندل <i>Dorema ammoniacum</i>	26 ^C
5	زیره سبز <i>Cuminum cyminum</i>	0 ^D
6	آویشن <i>Zataria multiflora</i>	0 ^D

جدول ۷- نتایج MIC و MBC برای باکتری تحت تیمارهای گوناگون

Table 7- MIC and MBC results for bacteria under various treatments

ردیف NO.	تیمارها Treatments	<i>T. harzianum</i>	
		MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)
1	آویشن <i>Zataria multiflora</i>	-	-
2	زیره سبز <i>Cuminum cyminum</i>	-	-
3	پپتید کایمری Chimeric peptide	62.5	125
4	کندل <i>Dorema ammoniacum</i>	125	250
5	چویل <i>Ferulago angulata</i>	250	250



شکل ۳- نتیجه حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره گیاه کندل بر روی قارچ تریکودرما در غلظت‌های:

A: شاهد، B: ۱۵/۶ µg/ml، C: ۳۱/۲۵ µg/ml، D: ۶۲/۵ µg/ml، E: ۱۲۵ µg/ml، F: ۲۵۰ µg/ml

Figure 3- Minimum inhibitory concentration (MIC) of Cannabis extract on *Trichoderma* fungi at concentrations:

A: Control, B: 15.6 µg/ml, C: 31.2 µg/ml, D: 62.5 µg/ml, E: 125 µg/ml, F: 250 µg/ml

بحث

امروزه قارچ خوراکی تکمه‌ای از مناسب‌ترین منابع تأمین پروتئین غذای انسان به شمار می‌آید، که مزایای بسیاری از جمله تولید زود بازده (در مقایسه با منابع پروتئینی حیوانی) و ارزش غذایی آن، سبب توجه روز افزون به این صنعت شده است. عوامل بیماری‌زا (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها) هر ساله موجب خسارت زیادی به تولیدات این صنعت در سراسر دنیا می‌شوند، بنابراین مبارزه با عوامل بیماری‌زا برای افزایش کمی و کیفی تولید اجتناب‌ناپذیر است. از این رو بطور معمول برخی ترکیبات حاوی کُله، فرمالین، بنومیل، اسپورگون (*Sporogon*) برای کنترل عوامل بیماری‌زا در این صنعت پیشنهاد می‌شود که متأسفانه مانند سایر سموم شیمیایی می‌تواند تهدیدی برای سلامتی انسان، به شمار آیند و دارای اثرات نامطلوب بر محیط زیست می‌باشند (۲۱ و ۴۱). از طرف دیگر استفاده از سموم شیمیایی، در مهار عوامل بیماری‌زای قارچ خوراکی به دلیل فاصله زمانی ناچیز بین تولید و مصرف، استفاده از آنها را محدودتر و گاه غیر ممکن ساخته است (۳۵)، بنابراین، امروزه تمایل به استفاده از ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی در صنعت تولید قارچ خوراکی روند رو به افزایشی را نشان می‌دهد (۱۳). استفاده از باکتری و قارچ‌کش‌های همسو با طبیعت مانند فرآورده‌های بدست آمده از گیاهان و پپتیدهای ضد میکروبی ممکن است اثرات مضر ترکیبات شیمیایی بر سلامت انسان و محیط زیست پیرامون را نداشته باشد و مدت زمان نگهداری محصولات را نیز افزایش دهند. از این رو در پژوهش حاضر استفاده از جایگزین‌هایی نظیر اسانس‌ها، عصاره‌ها و یک پپتید نو ترکیب به عنوان راهکاری نوین در مهار بیمارگرهای قارچ خوراکی مورد ارزیابی قرار گرفتند و توان ضد میکروبی این ترکیبات با ماهیت متفاوت مورد

مقایسه قرار گرفت. ارزیابی عملکرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در این پژوهش نشان داد که اسانس گیاه زیره سبز از اثر ضد باکتریایی مناسبی علیه باکتری *P. tolaasii* برخوردار بود که نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعات قبلی پیرامون اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه زیره سبز در مهار باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مطابقت داشت (۳۰ و ۳۹). اسانس آویشن نیز دارای عملکرد مناسبی علیه باکتری *P. tolaasii* بود که نتایج حاصل تکمیل کننده پژوهش‌های دیگری با تمرکز بر آثار ضد باکتریایی اسانس آویشن علیه باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی بود (۲۵). در پژوهشی دیگر با بررسی ۱۰ اسانس و ۱۰ ترکیب موثره مرتبط با اسانس‌ها علیه سه بیمارگر مهم قارچ خوراکی یعنی *T. harzianum* و *Verticillium fungicola* و باکتری *P. tolaasii* مشخص گردید که مهم‌ترین اسانس و ترکیب موثره اسانسی به ترتیب مرزنجوش (*Origanum vulgare*) و کارواکرول بودند (۴۱). اسانس‌های زیره سبز و آویشن با جلوگیری از رشد کامل قارچ *T. harzianum* نشان دادند از ظرفیت مناسبی در جلوگیری از رشد قارچ‌های سریع‌الرشد برخوردار هستند، که این نتایج با پژوهش دیگری که به مقایسه عملکرد ضد قارچی اسانس رزماری و آویشن بر روی قارچ عامل کپک خاکستری (*Botrytis cinerea*) پرداخته است، همخوانی داشت (۲۴). کارکرد اسانس زیره سبز و آویشن در مهار قارچ *T. harzianum* در پژوهش حاضر، بر سودمندی این دو اسانس در مهار عوامل بیمارگر قارچ خوراکی افزوده است، چرایی کارآمدی ضد میکروبی این دو اسانس را می‌توان بر اساس پژوهش‌های کوبیل و همکاران (۲۵) به وجود ترکیبات نظیر کومین آلدهید، γ -تریپنین، β -پینن و دیگر ترکیبات نظیر p-mentha-1, 4-dien-7-ol در این دو اسانس مرتبط دانست. نتایج ضد باکتری مناسب عصاره گیاه کندل بر روی *P. tolaasii* تایید

syringae pv. *Ralstonia solanacearum phaseoli* و *Pseudomonas phaseolicola* انجام شده است (۱۹). در پژوهشی که با هدف تولید لاکتوفریسین شتر در ریشه‌های مویین توتون و بررسی خاصیت ضدباکتریایی آن انجام گردید نشان داده شد بیان پپتید فوق در ریشه مویین توتون انجام می‌پذیرد (۱۶). خصوصیات ضد میکروبی پپتید فوق نشان داد، از بین شش باکتری بیماریزای گیاهی بیشترین اثر بر روی *Pectobacterium carotovorum* کمترین اثر بر روی *Pseudomonas syringae* مشاهده گردید (۱۶). مشابه با نتایج بدست آمده در این پژوهش با تحقیقی که در زمینه پپتیدهای نوترکیب انجام پذیرفت مشخص گردید، استفاده از غلظت‌های مختلف پپتید کایمری لاکتوفرامپین-لاکتوفریسین در کنترل عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی تکمه‌ای (*P. tolaasii*) نقش بسزایی داشت (۳). با توجه به خوراکی بودن پپتید فوق برای انسان و ماندگاری بالا (مقاومت به حرارت ۹۰ درجه سانتی‌گراد)، استفاده از آن جهت کنترل عوامل بیماریزای قارچ خوراکی به عنوان یک راهکار نوین مورد توجه قرار گرفته است (۳) در شرح مکانیزم عمل این پپتید نوترکیب نظیر سایر پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی این استدلال وجود دارد که به دلیل دارا بودن بار الکتریکی مثبت قابلیت اتصال و ایجاد منفذ در غشای سلول باکتری را داشته و این امر منجر به مرگ سلول می‌شود (۴۰). در مجموع با توجه به ویژگی‌های ذکر شده از اسانس‌ها، عصاره‌ها و پپتید نوترکیب کایمری می‌توان جهت کنترل و کاهش خسارت عوامل بیماریزای مهم در کشت و پرورش قارچ خوراکی تکمه‌ای از آنها به عنوان ترکیبات نوین در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی استفاده کرد که در حقیقت جایگزین مناسبی برای بکارگیری ترکیبات حاوی کُور و دیگر ترکیبات شیمیایی در سالن‌های پرورش قارچ می‌باشند. البته در انتها باید به این نکته اشاره نمود که استفاده از غلظت مناسب هر یک از ترکیبات مورد بررسی، مرحله‌ای از کشت قارچ خوراکی که استفاده از ترکیبات ضد میکروبی بیشترین اثر کنترلی را دارند و اثراتی که آنها بر کیفیت و بازارپسندی قارچ تکمه‌ای می‌گذارند، نیازمند تحقیقات بیشتر آزمایشگاهی و شرایط سالن‌های کشت و پرورش قارچ خوراکی تکمه‌ای می‌باشد.

کننده پژوهش‌های ساموئلسون و همکاران (۳۸) و تحقیقات دهقان و همکاران بود (۱۴). بر اساس مطالعات گذشته، ترکیبات کومارینی موجود در عصاره گیاه کندل مهمترین نقش را در قدرت ضد قارچی و باکتریایی این گیاه دارند (۲۸). استفاده از عصاره گیاه چویل در این پژوهش نتایج مناسبی در کنترل عوامل مهم بیماری‌زای قارچ خوراکی نشان داد که این اثر به ترکیبات ۲،۴،۵-ترترتیل بنزالدهید و α -پینن به عنوان اجزاء اصلی مواد مؤثره عصاره گیاه چویل مرتبط می‌باشد (۱۸). از دیگر راهبردهای ارزشمند در جایگزینی سموم شیمیایی، به کارگیری پتانسیل پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) می‌باشد، در همین راستا با به کارگیری پپتید کایمری نوترکیب برگرفته از شیر شتر نشان داده شد که فعالیت ضد باکتریایی این پپتید منحصر به فرد بوده و اساساً از این حیث قابل مقایسه با اسانس‌های موجود در مطالعه حاضر نیست. پپتیدهای ضد میکروبی یکی از گروه‌های متنوع ترکیبات ضد میکروبی هستند که به دلیل پیدایش مقاومت باکتری‌های پاتوژن به آنتی بیوتیک‌های رایج مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. این مولکول‌های شبه پروتئینی اغلب حاوی اسیدآمینه‌های تغییرشکل یافته و اصلاح شده ای هستند که در پلی پپتیدهای ساخته شده توسط ریبوزوم‌ها یافت نمی‌شوند (۲۳). علت این کارآمدی بی نظیر به اجزای ضد میکروبی این پپتید کایمری یعنی پپتیدهای لاکتوفریسین (Lactoferricin) و لاکتوفرامپین (Lactoferrampin) که قبلاً بر روی عوامل بیماریزای مختلف ثابت شده است بر می‌گردد (۱۵، ۱۶، ۲۶، ۴۰). نتایج یک پژوهش میزان سمیت پپتید کایمری Cecropin-Melittin برای یوکاریوت‌ها را مشخص نمود و نشان داد این پپتید در غلظت ۴۸ میلی‌گرم بر لیتر حدود ۵۰٪ گلبول‌های قرمز را نابود کرد و در غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر بعد از ۲۴ ساعت حدود ۴۵٪ سلول‌های CHO و ۲۲٪ از سلول‌های هلا را از بین برد. در واقع این غلظت‌ها از غلظت مؤثر بر پروکاریوت‌ها بیشتر بود. نتایج پژوهش فوق نشان داد اولین گام در بررسی و سنجش آزمایشگاهی پپتید CM11 به عنوان آنتی‌بیوتیک جدید مؤثر بود و این ترکیبات در غلظت‌های کم، بسیار کارآمد هستند (۶). بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوفریسین بر علیه باکترهای بیمارگر گیاهی تاکنون تنها در مورد اثر ضد میکروبی لاکتوفریسین شیر گاو بر ضد *Xanthomonas campestris* pv.

منابع

- 1- Ali G.S., and Reddy A. 2000. Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: in vitro growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 13(8): 847-859.
- 2- Akhlaghi M., Tarighi S., Farsi M., and Taheri P. 2015. Identification and investigation of some virulence factors of *Pseudomonas tolaasii* isolated from mushroom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51(4): 399-412. (In Persian)
- 3- Akhlaghi M., Tanhaiyan A., Shahriari F., and Tarighi S. 2016. Evaluating the Antibacterial Effect of the Lactoferrin-lactoferricin Chimeric Protein Obtained from the Domestic Livestock's Milk on Pathogenic Bacteria of

- Pseudomonas tolaasii*. Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress, 27- 30 August, 2016. (In Persian with English abstract)
- 4- Amini J., Farhang V., Javadi T., and Nazemi J. 2016. Antifungal effect of plant essential oils on controlling *Phytophthora* species. *Plant Pathology Journal*, 32(1): 16. (In Persian with English abstract)
 - 5- Andersson H., Tago D., and Treich N. 2014. Pesticides and health: A review of evidence on health effects, valuation of risks, and benefit-cost analysis. *Preference Measurement in Health*, 1-61.
 - 6- Azizi Bargini K. 2013. Evaluation of antimicrobial activity of Cecropin-Melittin Cimber peptide alone and with common antibiotics against common bacterial infections in hospitals. MC thesis degree, University of Mohaghegh Ardabili, 2013.
 - 7- Bradshaw J.P. 2003. Cationic antimicrobial peptides. *Bio Drugs*, 17(4): 233-240.
 - 8- Bruni N., Capucchio M.T., Biasibetti E., Pessione E., Cirrincione S., Giraudo L., Corona A., and Dosio F. 2016. Antimicrobial activity of Lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules* 21(6): 752.
 - 9- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard 8th Edition; CLSI Document M07-A8*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2009.
 - 10- Charles D.J., and Simon J.E. 1990. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115: 458-462.
 - 11- Damalas C.A., and Eleftherohorinos I.G. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(5): 1402-1419.
 - 12- Datta A., Bhattacharyya D., Singh S., Ghosh A., Schmidtchen A., and Malmsten M. 2016. Role of aromatic amino acids in lipopolysaccharide and membrane interactions of antimicrobial peptides for use in plant disease control. *Journal of Biological Chemistry*, 291(25): 13301-17.
 - 13- Dayan F.E., Cantrell C.L., and Duke S.O. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(12): 4022-34.
 - 14- Dehghan G.R., Zarini G.R., and Hajizadeh M. 2013. Phytochemical investigation and antimicrobial, antifungal and synergistic activities of chloroform fractions of the root of *Ferula szovitsiana*. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 15(6): 10-17. (In Persian with English abstract)
 - 15- Embleton N.D., Berrington J.E., McGuire W., Stewart C.J., and Cummings S.P. 2013. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 18(3): 143-9.
 - 16- Eslahi N., Niazi A., Aram F., Afsharifar A., and Taghavi S.M. 2015. Overexpression of Camel lactoferricin recombinant peptide in tobacco hairy roots and study of its antimicrobial activity. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51(4): 431-444.
 - 17- Farag R., Daw Z., Hewedi F., and El-Baroty G. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52(9): 665-7.
 - 18- Fayaz F., Rahmati Roodsari S., Gachkar L., Pourkaveh B., and Ghasemian Safaei H. 2016. The Antimicrobial activity of *Ferula gummosa* on bacterial strains isolated from patients with gastroenteritis. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*, 6: 20-4. (In Persian with English abstract)
 - 19- Fukuta S., Kawamoto K.I., Mizukami Y., Yoshimura Y., Ueda J.I., and Kanbe M. 2012. Transgenic tobacco plants expressing antimicrobial peptide bovine lactoferricin show enhanced resistance to phytopathogens. *Plant Biotechnology*, 29: 383-389.
 - 20- García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., and Rascón-Cruz Q. 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3): 226-36.
 - 21- Gea F.J., Navarro M.J., and Tello J.C. 2005. Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese in vitro. *Mycological Research*, 109(6): 741-5.
 - 22- Gurjar M.S., Ali S., Akhtar M., and Singh K.S. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Science*, 3(3): 425.
 - 23- Hamidi M., Mousavi Nasab S.D., Ahmadi N., Basati G.h., Aolad G.R., Salimian J., and Zargar M. 2013. Synthesis of antimicrobial peptides in bacteria. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 20(4).
 - 24- Hassani A., Jalili Marndi R., and Qusta Y. 2010. Use of essential oils for controlling mildew (*Botrytis cinerea*) disease Pear fruit. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 40-1(85-94). (In Persian with English abstract)
 - 25- Iacobellis N.S., Lo Cantore P., Capasso F., and Senatore F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1): 57-61.
 - 26- Iglesias-Figueroa B., Valdiviezo-Godina N., Siqueiros-Cendón T., Sinagawa-García S., Arévalo-Gallegos S., and Rascón-Cruz Q. 2016. High-level expression of recombinant bovine lactoferrin in *Pichia pastoris* with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6): 902.
 - 27- Kakon A., Choudhury M.B.K., and Saha S. 2012. Mushroom is an ideal food supplement. *Journal of Dhaka National Medical College & Hospital*, 18(1): 58-62.

- 28- Kumar R., Saha A., and Saha D. 2012. A new antifungal coumarin from *Clausena excavata* Fitoterapia, 83(1): 230-3.
- 29- Li Y. 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. Protein Expression and Purification, 80(2): 260-7.
- 30- Lopez P., Sanchez C., Batlle R., and Nerin C. 2005 . Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(17): 6939-46.
- 31- Mattila P., Suonpää K., and Piironen V. 2000. Functional properties of edible mushrooms. Nutrition, 16(7-8): 694-6.
- 32- Mzida M., Ben Khedira S., Ben Salemb M., Regaiegb W., and Rebaia T. 2016. Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol and aqueous extracts from *Urtica urens*. Pharmaceutical Biology, 55(1): 775-781.
- 33- Mosch J., Zeller W., Rieck M., Ullrich W., and Bonn W.G. Further studies on plant extracts with a resistance induction effect against *Erwinia amylovora*. International workshop on fire blight, Acta hort, 411: 361 - 6.
- 34- Plodpai P., Chuenchitt S., Petcharat V., Chakthong S., and Voravuthikunchai S.P. 2013. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. Crop Prot. 43: 65-71.
- 35- Potočnik I., Vukojević J., Stajić M., Rekanović E., Milijašević S., and Stepanović M. 2009. Toxicity of fungicides with different modes of action to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. Journal of Environmental Science and Health Part B., 44(8): 823-7.
- 36- Sadeghi M., and Hojati Z. 2016. Evaluation of anticancer peptide VEGF111b secretion in HEK293 human Cells. Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences, 21(1): 28-34
- 37- Sadler M. 2003. Nutritional properties of edible fungi. Nutrition Bulletin, 28(3): 305-308.
- 38- Samuelsen A.B. 2007. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. Journal of Ethnopharmacology, 71(1): 1-21.
- 39- Singh G., Kapoor I., Pandey S., Singh U., and Singh R. 2002. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. Phytotherapy Research, 16(7): 680-2.
- 40- Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Sharma S., and Singh T.P. 2013. Antimicrobial Lactoferrin peptides: The hidden players in the protective function of a multifunctional protein. International Journal of Peptides, 2013: 12.
- 41- Sokovic M., and Van Griensven L. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology, 116: 211-224.
- 42- Wang W.Y., Wong J.H., Ip D.T.M., Wan D.C.C., Cheung R.C., and Ng T.B. 2016. Bovine Lactoferrampin, Human Lactoferricin, and Lactoferrin 1-11 Inhibit Nuclear Translocation of HIV Integrase. Applied Biochemistry and Biotechnology, 179(7): 1202-12.



Comparison of Antimicrobial Activity of Essential Oils and Plant Extracts with Recombinant Peptide in Controlling of Some Pathogens of Cultivated White Button Mushrooms

F. Shariari^{1*}- A. Tanhaeian²- M. Akhlaghi³- N. Nazifi⁴

Received: 25-04-2018

Accepted: 18-11-2018

Introduction: The most serious diseases of cultivated mushrooms are caused by *Pseudomonas tolaasii* and *Trichoderma harzianum* pathogens. A common method of pathogen control on farms worldwide is the application of various chemical pesticides. Many of these substances are unsafe for human and environment. The interest in discovering and developing natural antimicrobials has significantly increased due to consumer preferences for foods that are free of chemical residues. So, a major challenge for mushroom growers is to control diseases with alternative compounds such as essential oils and plant extracts. Antimicrobial peptides (AMPs) were also known as potential antibiotic and considered as a new antimicrobial agents. In the present study, the antibacterial and antifungal potential of essential oils, plant extracts and a recombinant peptide were investigated for their pathogenicity. For this purpose, the essential oils of *Cuminum cyminum* and *Zataria multiflora* and the plant extracts of *Dorema ammoniacum* and *Ferulago angulata* and a recombinant peptide were evaluated for their antimicrobial and antifungal effects on the *P. tolaasii* and *T. harzianum* pathogens.

Materials and Methods: In this study, essential oils of *C. cyminum* and *Z. multiflora* were extracted by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus. The plant extracts (*D. ammoniacum* and *F. angulata*) were prepared using maceration method. Recombinant peptides (Lactoferricin-Lactoferrampin) were produced from Adherent Human Embryonic Kidney 293 (HEK293). The antifungal properties of essential oils, plant extract and AMPs were studied on growth inhibition. Antibacterial activity of substances was tested against *P. tolaasii* via disk-diffusion method respectively. Minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum bactericidal concentration (MBC) and Minimum fungicidal concentration (MFC) to the compounds were studied. All treatments were considered in a completely randomized block design with three replicates.

Results: The results of the antibacterial evaluations showed that the *Chimera peptide* have remarkable activity against pathogenic bacteria with a mean diameter of the zone inhibition region of 32.2mm, followed by *C. cyminum* and *D. ammoniacum* extracts with mean values of 7 and 6 mm respectively. Regarding to antifungal activity of substances isolated from above material, it was found that essential oils of *C. cyminum* and *Z. multiflora* completely prevent the growth of *T. harzianum*, followed by *D. ammoniacum* and *F. angulate* with mean values of 26 and 60.6 mm respectively. The lowest antifungal activity was observed for chimera peptide.

Discussion: The cultivated button mushroom is one of the most extensively cultivated mushroom in the world. The most serious diseases of cultivated mushrooms are caused by *P. tolaasii* and *T. harzianum* pathogens. The results of our study showed that the *C. cyminum* and *D. ammoniacum* have remarkable activity against pathogenic bacteria. Plant extracts, essential oils and their components have demonstrated strong fungistatic and antibacterial effects against pathogenic fungi and bacteria on cultivated mushrooms. Modes of action of essential oils in their interaction with bacteria have been quite revealed. It has been assumed that Thymol changes the permeability of cytoplasmic membrane of Gram-positive bacteria, acting as a proton exchanger, decreasing the pH gradient and causing a collapse of the proton motive force and eventually cell death. Regarding to antifungal activity, our results also showed that essential oils of *C.*

1 and 2- Professor and Ph.D. Graduate, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(*- Corresponding Author Email: Shahriari@um.ac.ir)

3- Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

cyminum and *Z. multiflora* completely prevent the growth of *T. harzianum*, followed by *D. ammoniacum* and *F. angulate*. One of the possible action mechanisms proposed that fungal growth may be reduced or totally inhibited due to monoterpenes present in essential oils which could increase the concentration of lipidic peroxides such as hydroxyl, alkoxy and alkoperoxy radicals and so bring about cell death. According to another mechanism, the essential oils would act on the hyphae of the mycelium, provoking exit of components from the cytoplasm, the loss of rigidity and integrity of the hypha cell wall, resulting in its collapse and death of the mycelium. In our study, a camel recombinant chimeric lactoferricin + lactoferrampin peptide was also tested for its antimicrobial activity. Our result showed that this recombinant peptide have remarkable activity against pathogenic bacteria. The details of the antibacterial mechanism for this recombinant peptide still are unknown. However, amino acid profile, sequence orientation and structural conformation of cationic peptides are the main features which make these peptides capable to inhibit bacterial growth by disrupting of the bacterial cell membrane. As general results it can be concluded that natural plant-derived antimicrobial as well as recombinant peptides can be used as alternatives to synthetic pesticides, however, further studies on safety and toxicity of these substances should be carried out before use.

Conclusion: In summary, this study shows that essential oils and plant extracts isolated from above plant material have remarkable antifungal activities against *T. harzianum*, while the chimera peptide showed complete inhibition against *P. tolaasii*. Thus all of this substance could become alternative to synthetic antimicrobial compounds for control of mushroom pathogens. However, further studies on safety and toxicity of these substances should be carried out before use.

Keywords: Antibacterial effect, Antifungal effect, Antimicrobial peptides, *Pseudomonas tolaasii*, *Trichoderma harzianum*