نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰ ، ص. ۱۱۵-۱۰۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 1, Spring 2011, P. 109-115
ISSN: 2008 - 4730

کنترل آلودگی ریزنمونه های ریزوم گیاه آلسترومریا (*Alstroemeria* sp.) در شرایط این ویترو

امیرغفار شهریاری[1*]- عبدالرضا باقری[2]- احمد شریفی[3]- نسرین مشتاقی[2]

تاریخ دریافت:۸۹/۶/۲۲
تاریخ پذیرش:۹۰/۲/۶

چکیده

آلسترومریا به عنوان یکی از گل های مهم شاخه بریده در دنیا عمدتا به روش این ویترو و با استفاده از ریزنمونه ریزوم تکثیر می شود. مشکل اصلی استفاده از این ریزنمونه، آلودگی بالای قارچی و باکتریایی می باشد بطوری که تهیه ریزنمونه استریل را با مشکل مواجه می کند. از این رو در این پژوهش تاثیر ترکیبات ضد عفونی کننده مختلفی چون هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه، نانو ذرات نقره، آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، پنی سیلین، سفوتاکسیم و قارچ کش کاربندازیم بر کنترل آلودگی ریزنمونه های حاصل از ریزوم ارقام کارالیس و بردئوکس مورد بررسی قرار گرفت. ریز نمونه ها پس از ضدعفونی با ترکیبات مختلف در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) و ۰/۲ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) کشت شدند. بعد از سه هفته درصد آلودگی ریزنمونه ها برای تیماری های مختلف اندازه گیری شد. نتایج نشان داد تیمار ریزنمونه ها با استفاده از قارچ کش کاربندازیم به میزان ۰/۴ درصد و ضد عفونی با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه وهیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه برای رقم کارالیس و ترکیب ضد عفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت۲۰ دقیقه و سپس انتقال به محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر پنی سیلین و استرپتومایسین برای رقم بردئوکس دارای کمترین میزان آلودگی بود. کنترل آلودگی در هر دو رقم بردئوکس وکارالیس تحت تاثیر کاربرد نانو ذرات نقره قرار نگرفت.

واژه های کلیدی: آلسترومریا، هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه، آنتی بیوتیک، کاربندازیم

مقدمه

آلسترومریا (*Alstroemeria* sp.) گیاهی دگرگشن بوده که خاستگاه آن آمریکای جنوبی است. این جنس دارای گونه های فراوانی در خانواده آلسترومریاسه است که امروزه تعدادی از آنها به عنوان گیاهان زینتی برای تولید گل های شاخه بریده، گیاهان باغی، باغچه ای و یا گلدانی پرورش داده می شوند (۵). در حال حاضر آلسترومریا به علت داشتن گل های زیبا و بادوام در بازارهای جهانی گل و گیاه به عنوان یکی از مهم ترین و پرطرفدارترین گل های زینتی شاخه بریده به شمار می رود (۱۱). آلسترومریا به طور معمول با استفاده از ریزوم تکثیر می شود، اما آلودگی های ویروسی، سرعت کم تکثیر و محدودیت های فصلی، سبب محدود شدن استفاده از این روش شده است (۲۰). در حال حاضر برای فایق آمدن بر مشکلات روش های معمول تکثیر این گیاه زینتی وتولید گیاهان عاری از ویروس، استفاده از روش های کشت این ویترو در این گیاه اهمیت زیادی پیدا کرده است. برای تکثیر این ویتروی آلسترومریا معمولا از ریزنمونه های جوانه انتهایی شاخه (۱۶)، جوانه جانبی (۱۲) و ریزوم (۵، ۷، ۸، ۹، ۱۳، ۱۴و۲۰) استفاده می گردد. با این حال سرعت باززایی جوانه انتهایی ریزوم (نوک ریزوم) از سایر ریزنمونه ها بیشتر گزارش شده است (۱۳). آلودگی های قارچی و باکتریایی از مشکلات اصلی استفاده از اندام های زیر زمینی به عنوان ریز نمونه است (۱۱و۱۵). هنگامی که هدف کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، آلودگی های قارچی و باکتریایی می تواند لطمات جبران ناپذیری به آن وارد آورد (۱۷). استفاده از مواد ضد عفونی کننده سطحی یکی از روش های ممکن برای کاهش این آلودگی ها است. برای گند زدایی سطحی عموما از الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم و کلرید جیوه استفاده می شود. آنتی بیوتیک ها نیز برای کنترل آلودگی های داخلی و خارجی موثر هستند. آلودگی های داخلی معمولا چندین هفته بعد از کشت ظاهر می شوند. این آلودگی ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، اما بر روی رشد، تقسیم و

۱،۲و۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: Email: shahriari.ag@gmail.com)
۳- مربی گروه پژوهشی فناوری کشت بافت و ازدیاد گیاهان جهاد دانشگاهی مشهد

سبز شدن ریز نمونه ها تاثیر می گذارند (۱۷). از آنتی بیوتیک های متعددی جهت کنترل آلودگی های با منشا داخلی، به صورت منفرد یا ترکیبی استفاده شده است (۱۷). با این وجود احتمال دارد که ریزنمونه ها به آنتی بیوتیک حساس باشند. علاوه بر این، به علت استفاده از غلظت های بالای آنتی بیوتیک، احتمال وقوع جهش های نقطه ای و نیز اختلال در زنجیره انتقال الکترونی میتوکندری نیز گزارش شده است (۲). اخیرا استفاده از نانو ذرات نقره نیز برای ضد عفونی ریز نمونه ها در گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis*) گزارش شده است (۲).

بیشتر تحقیقات انجام شده بر روی کشت بافت گیاه آلسترومریا مربوط به بررسی غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد بر شاخه زایی و ریشه زایی ریزنمونه ریزوم بوده است و علیرغم گزارش های مختلف مبنی بر وجود آلودگی بالا در کشت این ویترو، تحقیقات اندکی درخصوص تعیین بهترین روش های تهیه ریزنمونه استریل در این گیاه انجام شده است (۵ و۱۴). هیپوکلریت سدیم بر ضد عفونی برخی از ارقام آلسترومریا موثر بوده است، با این وجود در بعضی از ارقام نیز تاثیر چندانی بر روی میزان آلودگی نداشته است (۱). تاکنون در این گیاه استفاده از سایر مواد ضدعفونی کننده جهت تهیه ریز نمونه استریل گزارش نشده است. لذا هدف از این پژوهش بررسی تاثیر ضد عفونی کننده های مختلفی چون هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه، نانو ذرات نقره، آنتی بیوتیک های پنی سیلین، استرپتومایسین و سفوتاکسیم و قارچ کش کاربندازیم بر روی کنترل درصد آلودگی ریزنمونه حاصل از ریزوم گیاه آلسترومریا بوده است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و تهیه ریزنمونه

در این پژوهش دو رقم آلسترومریا کارالیس[1] و بردئوکس[2] از گلخانه گیاهان زینتی سعادت شهر استان فارس تهیه گردید و به گلخانه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی مشهد انتقال داده شد. گیاهان در جعبه های حاوی مخلوط ۲ به ۱ کوکوپیت و پرلیت کشت شدند و بعد از رشد کافی از طریق ریزوم تکثیر شدند. با توجه به تاثیر شرایط رشدی گیاه مادری بر درصد آلودگی ریز نمونه ها در شرایط این ویترو ، ارقام در شرایط مطلوب دمای ۲±۲۰ درجه سانتیگراد و فتوپریودی ۱۶ به ۸ روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. در طول دوره رشد گیاهان با محلول غذایی کریستالون ۰/۲ درصد و آهن ۰/۰۱ درصد آبیاری شدند و پس از رشد کافی که تعداد مناسب ریزوم بدست آید (حداقل یک ماه) از آنها برای انجام پژوهش استفاده شد.

به منظور تهیه ریزنمونه، گیاهچه ها از بستر کشت خارج و ریزوم‌ها به وسیله یک چاقوی تیز تاگره اول برش داده شدند. پس از برش دهی ریزوم ها (شکل۱،الف). عمل شستشوی جوانه های انتهایی (نوک ریزوم) با استفاده از آب جاری انجام شد و سپس تیمارهای ضد عفونی اعمال گردید.

تیمار های مختلف ضد عفونی

جهت ضدعفونی ریزنمونه ها از ترکیبات ضدعفونی کننده مختلف شامل: هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه، نانو ذرات نقره، قارچ کش کاربندازیم و نیز آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، پنی سیلین و سفوتاکسیم در پنج مرحله با انجام آزمایشات جداگانه استفاده شد. ابتدا برای بررسی اثر مقادیر مختلف هیپوکلریت سدیم بر میزان آلودگی ارقام کارالیس و بردئوکس، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار که هر تکرار حاوی ۲۰ ریز نمونه بود، انجام شد. در این مرحله ارقام به عنوان فاکتور اول و تیمار های ضدعفونی به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد (جدول۱، مرحله یک). در مرحله دوم به منظور بررسی توام وایتکس و کلرید جیوه بر کنترل آلودگی ارقام بردئوکس و کارالیس از کلرید جیوه با سه غلظت مختلف پس از ضدعفونی ریزنمونه ها با هیپوکلریت سدیم استفاده گردید (جدول ۱، مرحله دوم). با توجه به مرگ کامل ریزنمونه های مربوط به رقم بردئوکس، تجزیه واریانس داده ها برای رقم کارالیس به صورت طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار حاوی ۲۰ ریزنمونه انجام شد. با توجه به موفق نبودن کنترل آلودگی توسط تیمار های قبلی و گزارش های موفق استفاده از نانو ذرات نقره در کنترل آلودگی در برخی از گیاهان (۲) در این مرحله، ابتدا از آزمایش مقدماتی با غلظت ها و زمان های مختلف نانوذرات نقره انجام شد و بر اساس آستانه تحمل، عدم سیاه شدگی و زنده مانی ریزنمونه ها، ضدعفونی ریزنمونه با مقادیر ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره برای رقم کارالیس و ۲۰۰ و۳۰۰ میلی گرم در لیتر برای رقم بردئوکس انجام شد و اثر آن ها بر کنترل آلودگی نسبت به تیمار الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه در طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار حاوی ۲۰ ریزنمونه بررسی گردید (جدول ۱، مرحله سوم).

در مرحله بعدی آزمایش، اثر مقادیر آنتی بیوتیک های مختلف شامل پنی سیلین، استرپتومایسین و سفوتاکسیم بر کنترل آلودگی ریزنمونه ها نسبت به تیمار الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه در طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار با ۲۰ ریز نمونه در رقم بردئوکس مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب غلظت آنتی بیوتیک های مورد آزمایش، بر اساس نتایج آزمایش های مقدماتی صورت گرفت.

1- Caralis
2- Bordeaux

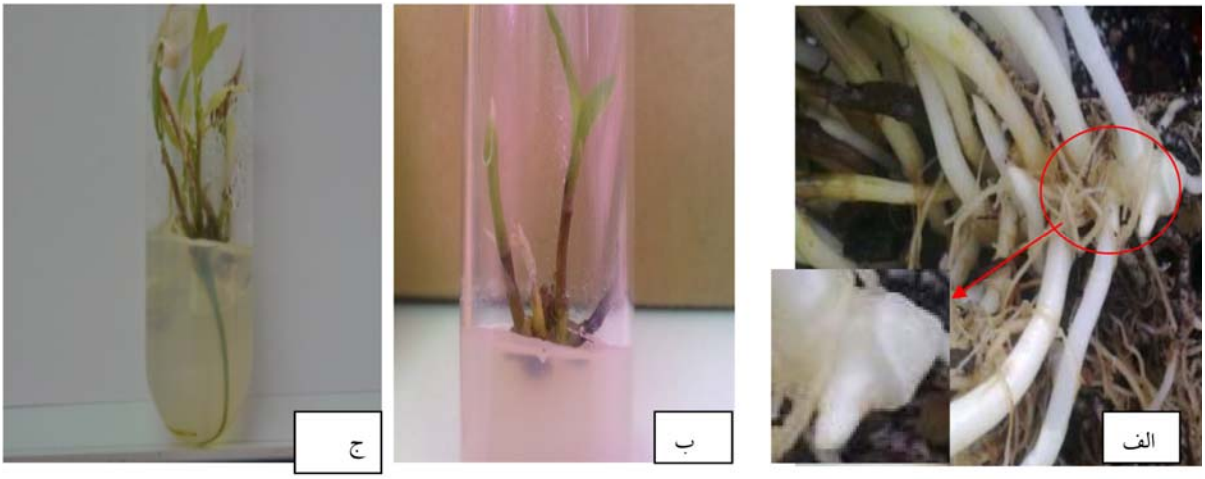
جدول۱- مراحل مختلف آزمایش انجام شده برای کاهش آلودگی ریزنمونه ها ی حاصل از ریزوم.

مراحل آزمایش	ارقام	تیمارهای ضد عفونی اعمال شده
اول	بردئوکس و کارالیس	الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۲/۵٪ به مدت ۲۵ دقیقه الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه
دوم	بردئوکس و کارالیس	وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه وکلرید جیوه ۰/۰۶ درصد به مدت ۱۰ دقیقه وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه
سوم	بردئوکس	الکل ۷۰٪ به مدت۱ دقیقه، وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و نانو ذرات نقره به مقدار ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به مدت ۴۰ دقیقه الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و نانو ذرات نقره مقدار ۳۰۰ میلی گرم به مدت ۲۰ دقیقه
	کارالیس	الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و نانوذرات نقره ۵۰ میلی گرم در لیتر به مدت ۴۰ دقیقه الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و ۱۰۰ میلی گرم در نانوذرات نقره به مدت ۲۰ دقیقه
چهارم	بردئوکس	الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه وکشت بر روی محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر از هریک از آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه ، وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و کشت بر روی محیط کشت حاوی ۴۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم
پنجم	کارالیس	تیمار گیاهان آلسترومریا با ۴ گرم در لیتر کاربندازیم در گلخانه در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قبل از تهیه ریز نمونه و ضد عفونی ریز نمونه ها در آزمایشگاه پس از شستشو با آب جاری با استفاده از الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه.

نتایج این بررسی ها نشان داد که غلظت های اندک هرکدام از آنتی بیوتیک ها در کنترل آلودگی موثر نمی باشد. از آنجا که شرایط نگهداری گیاه مادری بر میزان آلودگی در شرایط این ویترو تاثیر می گذارد در مرحله پنجم آزمایش، از قارچ کش کاربندازیم برای ضد عفونی بستر کشت گیاهان در گلخانه استفاده شد و سپس در آزمایشگاه، تیمار ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم اعمال گردید (جدول۱). مقایسه اثر کاربندازیم بر کنترل آلودگی نسبت به تیمار فاقد کاربندازیم (الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه) با استفاده از آزمون t به روش مقایسات جفت شده انجام شد. در همه مراحل فوق، ریز نمونه ها پس از شستشو در آب جاری و اعمال تیمار های ضد عفونی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیترBA (بنزیل آدنین) و ۰/۲ میلی گرم در لیترNAA (نفتالن استیک اسید) و شرایط نوری ۱۶ ساعت در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گرادکشت شدند. در همه مراحل آزمایش به استثنای مرحله چهارم، واکشت ریزنمونه ها پس از چهار هفته انجام شد. در این مرحله، جهت جلوگیری از اثر منفی آنتی بیوتیک بر ادامه رشد، آنتی بیوتیک از محیط کشت واکشت حذف شد. در کلیه آزمایش ها بعد از گذشت سه هفته از اعمال تیمارهای ضدعفونی، میزان آلودگی تیمار های مختلف اندازه گیری شد. ریزنمونه های فاقد آلودگی که با هیپوکلریت و نانوذرات نقره ضد عفونی شده بودند، در هفته های پنجم و هفتم به ترتیب ساقه زایی (شکل ۱، ب) و ریشه زایی را آغازکردند (شکل ۱، ج). داده های حاصل از مراحل مختلف آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS آنالیز شد و مقایسه میانگین ها به غیر از داده های حاصل از مرحله پنجم، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

مرحله اول : تیمار هیپوکلریت سدیم. نتایج تجزیه واریانس داده های این آزمایش بیانگر تاثیر معنی دار ($P<۰/۰۵$) تیمارهای ضد عفونی حاوی هیپوکلریت سدیم به عنوان عامل تغییر بر درصد آلودگی بود (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین و کمترین درصد آلودگی به ترتیب در تیمارهای ضد عفونی حاوی ۲ و ۳ درصد هیپوکلریت سدیم بدست آمد (به ترتیب ۹۲ و ۶۷ درصد). اثر رقم نیز بر درصد آلودگی معنی دار بود ، به نحوی که رقم کارالیس در تیمار های ضد عفونی هیپوکلریت سدیم آلودگی کمتری نسبت به رقم بردئوکس داشت (به ترتیب ۷۲/۴ و ۸۹ درصد).



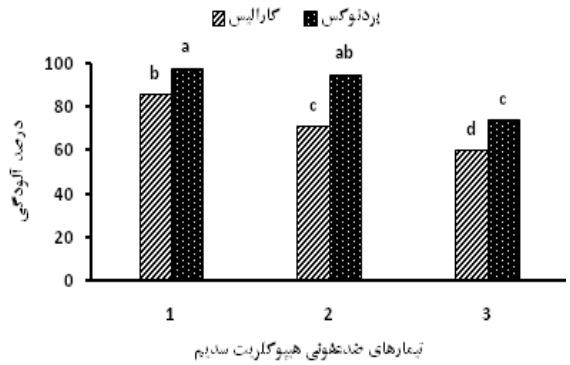
شکل۱- نحوه تهیه ریزنمونه نوک ریزوم(الف) ، رشد ریزنمونه ها و تولید شاخساره در هفته پنجم(ب) و ریشه دار شدن گیاهچه ها در هفته هفتم(ج).

جدول۲- جدول تجزیه واریانس درصد آلودگی ریزنمونه های ریزوم، تحت تاثیر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم و رقم

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات
ضدعفونی	۲	۱۹۲۸/۷**
رقم	۱	۱۲۳۳/۳**
ضدعفونی × رقم	۲	۱۱۶/۷*
خطا	۱۲	۲۰۰/۶
کل	۱۷	۳۴۷۹/۶

** و*: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪

اثر متقابل تیمار ضد عفونی و رقم معنی دار بود به گونه ای که در تمام سطوح تیمار های ضد عفونی رقم کارالیس آلودگی کمتری نسبت به رقم بردئوکس داشت (شکل۲). عموما ریز نمونه هایی که از اندام های زیر زمینی مانند ریزوم، پیاز و طوقه تهیه می شوند به شدت آلوده بوده و تهیه ریز نمونه استریل در آن ها بسیار مشکل است. هیپوکلریت سدیم به عنوان یک ضد عفونی کننده عمومی توانایی کنترل محدود این آلودگی ها را دارد (۱و۱۲). پدرسون و براند (۱۵) از محلول هیپوکلریت سدیم (۱ تا ۵ درصد) در مدت زمان های ۱، ۵ و ۱۰ دقیقه استفاده کردند و نتایج نشان داد بهترین نتیجه زمانی بدست می آیدکه ضد عفونی در ۳ مرحله (۱، ۵ و ۱۰ دقیقه) انجام شد. بهلولی زنجانی و همکاران (۱) نیز از هیپوکلریت سدیم برای ضد عفونی ریزوم پنج رقم آلسترومریا استفاده کرد. نتایج وی نشان داد که هیپوکلریت سدیم بر کاهش آلودگی رقم جامایکا تاثیر داشت و بر روی سایر ارقام تاثیر چندانی نداشت. نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز بر کنترل نسبی آلودگی توسط هیپوکلریت سدیم دلالت دارد .



شکل ۲- اثر متقابل رقم و مقادیر مختلف هیپوکلریت سدیم بر کنترل درصد آلودگی ریز نمونه ریزوم.

(۱): الکل ۷۰٪ به مدت ۱دقیقه و وایتکس ۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه،(۲): الکل ۷۰٪ به مدت ۱دقیقه و وایتکس ۲/۵٪ به مدت ۲۵ دقیقه، (۳): الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه. میانگین های با حروف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد نیستند.

مرحله دوم : تیمارکلرید جیوه. کلرید جیوه به عنوان یک ضد عفونی کننده سطحی عمدتا همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می شود و کنترل طیف باکتری ها و قارچ ها و کارایی ضد عفونی را افزایش می دهد. نتایج حاصل از این مرحله نشان داد، که استفاده از کلرید جیوه، در فرایند ضد عفونی ریزنمونه ها با استفاده از وایتکس ۳ درصد باعث بهبود کنترل آلودگی در رقم کارالیس شد به نحوی که در

تیمار ۰/۰۳ درصد کلرید جیوه، میزان آلودگی ریزنمونه ها ۵۰ درصد بود (جدول۳). بین سطوح مختلف کلرید جیوه از نظر کنترل آلودگی اختلاف معنی داری وجود داشت. لازم به توضیح است که با افزایش میزان کلرید جیوه بکار رفته برای ضدعفونی از ۰/۰۳ درصد به ۰/۱ درصد، رشد گیاهچه ها کاهش یافت، بطوری که در تیمار ۰/۱ درصد، ریز نمونه ها فقط سبز شدند و بندرت شاخه تولید کردند. همچنین ریز نمونه هایی که در غلظت ۰/۰۳ درصدکلرید جیوه ضد عفونی شده بودند شاخه هایی تولید کردند که از لحاظ ظاهری ضعیف تر بوده و به سختی ریشه تولید می کردند. در رقم بردئوکس علیرغم کنترل کامل آلودگی ریزنمونه ها، تمام غلظت های اعمال شده باعث عدم رشد ریزنمونه ها شد. آزمون تترازولیوم، مرگ ریزنمونه ها را تایید نمود. گزارش هایی در مورد تاثیر کلرید جیوه بر مرگ ریز نمونه ها وجود دارد. در پژوهشی از غلظت ۰/۱ درصد کلرید جیوه در زمان های متفاوت برای اندازه گیری میزان آلودگی، زنده مانی و مرگ و میر جوانه های انگور استفاده شد (۱۰). نتایج نشان داد که کلرید جیوه بطور نسبی آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه ها را کنترل می کند اما درصد زنده مانی ریزنمونه ها را کاهش می دهد، بطوری که در یکی از ارقام باعث مرگ کامل ریز نمونه ها شد. بنظر می رسد برخی گیاهان نسبت به کلرید جیوه حساس باشند و تعیین مقدار مناسب این ماده نقش بسیار مهمی در تهیه ریزنمونه سالم و زنده دارد. علم و همکاران (۳) از کلرید جیوه ۰/۱ درصد برای کاهش آلودگی ریز نمونه حاصل از گره گیاه همیشه سبز چند ساله *Operculina turpethum* استفاده نموده و نتایج مثبتی از نظرکنترل آلودگی گزارش کردند. به نظر می رسدکه در گیاه آلسترومریا غلظت بالاتر از ۰/۱ درصد باعث مرگ ریز نمونه ها می شود و استفاده از غلظت های کمتر و زمان های کوتاه تر می تواند راه حلی برای کاهش آلودگی در این گیاه باشد.

مرحله سوم: تیمار نانوذرات نقره. اخیرا قابلیت استفاده از نانوذرات در کنترل آلودگی های محیط کشت در کشت بافت گیاهی در حال بررسی است. بنظر می رسد این ترکیبات به علت وجود نسبت سطح به حجم زیاد، قابلیت کنترل آلودگی های سطحی و داخلی را داشته باشند (۱۹). نتایج این پژوهش در مورد تاثیر این ترکیبات برکنترل آلودگی نشان داد که بین تیمار های ۵۰ میلی گرم در لیتر با ۵۸ درصد آلودگی و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر با ۵۷ درصد آلودگی در رقم کارالیس، همچنین بین غلظت های ۲۰۰ میلی گرم در لیتر با ۷۲ درصد آلودگی و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر با ۷۰ درصد آلودگی در رقم بردئوکس تفاوت معنی داری وجود ندارد (سطح معنی دار ۵ درصد). همچنین از لحاظ درصد آلودگی نیز تفاوت معنی داری بین استفاده از نانو ذرات نقره و عدم استفاده از آن (تیمار شاهد شامل الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و وایتکس ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه) وجود ندارد (سطح معنی دار ۵ درصد). این در حالی است که عابدی و همکاران (۲) برای ضدعفونی ریزنمونه گره سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) از ترکیب ضد عفونی کننده های الکل، هیپوکلریت سدیم و نانوذرات نقره استفاده کردند. آنها گزارش کردند که استفاده از غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر این ماده کارایی ضدعفونی الکل و هیپوکلریت سدیم را افزایش می دهد. اما هنوز گزارش های زیادی در مورد تاثیر نانو ذرات نقره بر کاهش آلودگی وجود ندارد و باید پژوهش های بیشتری با استفاده از گیاهان و ریزنمونه های متفاوت انجام شود تا در نهایت تاثیر یا عدم تاثیر این ماده بر میزان آلودگی مشخص شود.

مرحله چهارم: تیمار آنتی بیوتیک ها. آلودگی های باکتریایی که منشا داخلی دارند و در درون بافت ریز نمونه هستند معمولا با استفاده از ضد عفونی کننده های سطحی از بین نمی روند . آنتی بیوتیک ها در مواردی می توانند در کنترل آلودگی های ریزنمونه ها مفید باشند و درصد آلودگی ریزنمونه ها را کاهش دهد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از آنتی بیوتیک ها در فرایند ضد عفونی ریزنمونه ها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۳ درصد باعث بهبود کنترل آلودگی شد. استفاده از ترکیب آنتی بیوتیک های استرپتومایسین و پنی سیلین (هر کدام ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) در مقایسه با آنتی بیوتیک سفوتاکسیم (۴۰۰ میلی گرم در لیتر) اثر بهتری در کنترل آلودگی داشت، بطوری که کاربرد توام این دو آنتی بیوتیک در مقایسه با کاربرد جداگانه آنتی بیوتیک سفوتاکسیم از نظر درصد آلودگی و درصد سبزشدگی وضعیت بهتری داشت (جدول۴). اما ریز نمونه های سبز شده در محیط کشت حاوی پنی سیلین و استرپتو مایسین پس از واکشت در محیط کشت فاقد آنتی بیوتیک، تولید شاخساره های کوتاه نمودند و ریشه زایی آنها نیز بعد از زمان طولانی آغاز شد.

از مشکلات عمده کشت بافت گیاهی، آلودگی های باکتریایی است و معمولا کنترل این نوع آلودگی ها بویژه از نوع داخلی مشکل است و هفته ها بعد از کشت بر روی محیط کشت ظاهر می شوند (۱۷). از آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، ریفامپیسین، پنی سیلین و سفوتاکسیم به تنهایی یا به صورت ترکیبی در محیط کشت برای کنترل آلودگی های باکتریایی دارای منشای داخلی در کشت این ویترو استفاده شده است (۱۷). همچنین از این آنتی بیوتیک ها در فرایند ضد عفونی به صورت قبل و یا بعد از ضد عفونی سطحی برای کنترل آلودگی های باکتریایی استفاده شده است (۱۶). صالحی و خوشخوی (۱۸) برای کنترل آلودگی باکتریایی در رُز مینیاتوری از محلول جنتامایسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بعد از ضد عفونی سطحی استفاده کردند. در مطالعه ای بر روی لیلیوم، بعد از ضد عفونی کردن قطعات پیاز با الکل و هیپوکلریت سدیم، آن ها را بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین و پنی سیلین هر کدام با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیترکشت نمودند و نتیجه مناسبی در کنترل آلودگی کسب کردند (۴).

جدول۳- اثر تیمار کلرید جیوه بر درصد آلودگی ریزنمونه های حاصل از ریزوم ، طول شاخساره و تعداد شاحساره های تولید شده در رقم کارالیس

تیمار های ضدعفونی	درصد آلودگی	طول شاخه	تعداد شاخه
وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه	۶۰ a	۳/۱۶ a	۴/۰۰ a
وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه	۵۰ b	۱/۵۰ b	۱/۹۰ b
وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه وکلرید جیوه ۰/۰۶ درصد به مدت ۱۰ دقیقه	۴۶ bc	۱/۰۸ bc	۰/۷۵ c
وایتکس ۳ ٪ به مدت ۲۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه	۴۰ c	۰/۴۶ c	۰/۲۰ d

میانگین های با حروف مشترک دارای اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد نیستند.

جدول ٤- اثر آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، پنی سیلین و استرپتومایسین بر درصد آلودگی ، سبز شدگی و سیاه شدگی ریزنمونه رقم بردئوکس

تیمار های ضد عفونی	نوع و غلظت آنتی بیوتیک درمحیط کشت	درصد آلودگی	درصد سبز شدگی	درصد سیاه شدگی
الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه ،وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه	عدم استفاده از آنتی بیوتیک	۷۴ a	۱۵ c	۱۱ a
الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه ،وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه	سفوتاکسیم (۴۰۰ میلی گرم در لیتر)	۶۲ b	۲۵ b	۱۳ a
الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه ،وایتکس ۳٪ به مدت ۲۰ دقیقه	پنی سیلین و استرپتومایسین(۲۰۰ میلی گرم درلیتر)	۴۰ c	۵۰ a	۱۰a

میانگین های با حروف مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد نیستند.

تاکنون گزارشی در مورد استفاده ازآنتی بیوتیک ها در کنترل آلودگی های باکتریایی ریزنمونه نوک ریزوم های آلسترومریا ارائه نشده است، اما نتایج این پژوهش نشان می دهد که استفاده ترکیبی آنتی بیوتیک ها با غلظت پایین تر در مقایسه با استفاده از یک آنتی بیوتیک با غلظت بالا دارای نتایج بهتری است. استفاده از سایر آنتی بیوتیک هاکه ریز نمونه ریزوم حساسیت کمتری نسبت به آن ها داشته باشد می تواند راه حل دیگری برای کاهش آلودگی های باکتریایی باشد.

مرحله پنجم: قارچ کش کاربندازیم. کاربندازیم قارچ کشی سیستمیک با طیف وسیع کنترل قارچ ها است و از آن به عنوان یک قارچ کش عمومی استفاده می شود. نتایج برخی گزارش ها نشان می دهد که تیمار گیاهچه ها قبل از ضد عفونی با این قارچ کش می تواند کارایی ضد عفونی را افزایش دهد (۲۱). آزمون مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون t نشان داد که کاربندازیم تاثیر معنی داری (۱۳/۰= t) بر کاهش درصد آلودگی ریزنمونه ها دارد. به نحوی که تیمار رقم کارالیس با قارچ کش کاربندازیم به میزان ۴ گرم در لیتر در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت قبل از تهیه ریز نمونه، میزان آلودگی را از ۶۰ درصد در تیمار شاهد (تیمار فاقد کاربندازیم و ضد عفونی با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه) به ۴۷ درصد کاهش داد. تاکنون گزارشی در خصوص اثر تیمار گیاهچه ها با استفاده از قارچ کش کاربندازیم قبل از ضد عفونی در کشت بافت آلسترومریا وجود ندارد اما از قارچ کش سیکلوهگزامید با غلظت ۵۰ و۱۰۰ میلی گرم در لیتر برای کاهش آلودگی ریزنمونه ها در محیط کشت استفاده شده اما تاثیری برکاهش آلودگی نداشته است (۱). به نظر می رسد تاثیر کاربندازیم بر کاهش آلودگی رقم کارالیس به این علت بوده است که این قارچ کش تا حدی توانسته فلور قارچی ریزنمونه و بسترکشت را کنترل نموده و شرایط ضد عفونی را با استفاده از الکل و هیپوکلریت سدیم فراهم کند.

نتیجه گیری

هنگامی که هدف کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، کنترل آلودگی و تهیه ریزنمونه استریل از اهمیت زیادی برخوردار است. استفاده از مواد ضد عفونی کننده یکی از مهم ترین روش های کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی در کشت این ویترو است. بر اساس نتایج این پژوهش، هیپوکلریت سدیم به طور متوسط میزان آلودگی را بین ۲۵ تا ۴۰ درصد کاهش داد. استفاده از کلرید جیوه به عنوان مکمل وایتکس، آلودگی را به میزان بیشتری کنترل کرد (متوسط ۵۵ درصد) ولی اثرات منفی بر روی رشد ریزنمونه ها و تولید شاخساره داشت . نانوذرات در هر دو رقم تاثیر چندانی بر کنترل آلودگی نداشت. تیمار ریزنمونه های حاصل از رقم کارالیس با قارچ کش قبل از ضد عفونی سطحی و همچنین استفاده از آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسن در محیط کشت، میزان آلودگی ریزنمونه ها را به

صورت معنی داری کاهش داد. به نظر می رسد استفاده از قارچ کش ها و آنتی بیوتیک ها می تواند روش جدیدی برای کنترل آلودگی ریزنمونه های حاصل از نوک ریزوم گیاه آلسترومریا باشد که این نیازمند پژوهشی است که طیف وسیعی از قارچ کش ها و آنتی بیوتیک ها را در بر گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بخاطر تامین بخشی از هزینه های تحقیق و همچنین از گروه کشت بافت و ازدیاد گیاهان جهاد دانشگاهی مشهد بخاطر فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

۱- بهلولی زنجانی س. حمیداوغلی ی. و حاتم زاده ع. ۱۳۸۴ . بررسی کشت درون شیشه ای گیاه آلسترومریا. پایان نامه کارشناسی ارشد. ۱۰۰ص.

2- Abedi G., Salehi H., and khosh-khui M. 2008. A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian *(Valeriana officinalis* L.) tissue culture. Acta. Physiol. Plant 30:709-714.

3- Alam M.J., Alam I., Sharmin S.A., Rahman M.M., Anisuzzaman M., and Alam M.F. 2010. Micropropagation and antimicrobial of *Operculina turpethum* an endangered medicinal plant. Plant Omics Journal 3:40-46.

4- Altan F., Burun B., and Sahin N. 2010. Fungal contamination observerd during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substance applied after sterilization. African Journal of Biotechnology 9:991-995.

5- Bond S., and Alderson P.G. 1993. The influence of apical dominance on the *in vitro* multiplication of the rhizome of *Alesteromeria*. J. Hort. Sci. 68:905-910.

6- Chiari A., and Bridgen M.P. 2000. Rhizome splitting: a new micropropagation technique to increase *in vitro* propagule yield in *Alstroemeria*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 62:39-46.

7- Gabryszewska E. 1995. Plant regeneration of *Alstroemeria in vitro*. Acta. Agrobotanica 48:95-104.

8- Gabryszewska E., and Hempel M. 1985. The influence of cytokinins and auxins on *Alesteromeria* in tissue culture. Acta. Hort. 167:295-300.

9- Hakkaart F.A., and Versluijs J.M.A. 1988. Virus elimination by meristem tip culture from a range of *Alesteromeria* cultivars. Neth. J. Plant Pathol. 94:49-56.

10- Kashif M., Sajid G.M., and Anwar R. 2005. Effect of duration of mercuric chloride treatment on culture viability, contamination and mortality of various accessions of grapes. Sarhad. J. Agric. 21:25-28.

11- Khaleghi A., Sahraroo A., Rasoulnia I.N., and Ataei R. 2008. *In vitro* propagartion of *Alstromeria* cv. Fuego. American Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science 3:492-497.

12- Lin H.S., De Jue M.J., and Jacobsen E. 1997. Direct shoot regeneration from excised leaf explants of *in vitro* grown seedlings of *Alstromemeria* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 16:770-774.

13- Lin H.S., De Jue M.J., and Jacobsen E. 2000. The application of leafy explant micropropagation protocol in enhancing the multiplication efficiency of *Alstroemeria*. Scientia Horticulture 87:307-318.

14- Lin W.C., and Monette P.L. 1987. *In vitro* propagation of *Alstroemeria Alsaan*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 9:29-35.

15- Pederson C., and Brandt K. 1992. A method for disinfection of underground rhizome tips of *Alesteromeria* and *Heliconia*. Acta. Hort. 325:499-504.

16- Pedraz Santos M.E., Lopez Peralta M.C., Gonzalez Hernandez V.A., Engleman Clark E.M., and P. Sanchez Garcia. 2005. *In vitro* regeneration of *Alstroemeria* cv Yellow King by direct organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 189-198.

17- Reed B. M, Buckley P.M., and Dewllde T.N. 1994. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. In Vitro Cell. Dev. Biol. 31:53-57.

18- Salehi H., and Khosh-Khui M. 1997. A simple procedure of disinfection of 'Baby Masquerade' of miniature rose explants. Sci. Hortic. 68:145-148.

19- Sondi I., and Salopek-Sondi B. 2004. Silver nano particles as antimicrobial aget: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J. Colloid Interface. Sci. 275:177-182.

20- Van Zaayen A. 1995. Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. Wiley Publishers, Chichester, West Sussex, UK, 237-249.

21- Zhang L.Z., Wei N., Wu Q.X., and Liping M. 2007. Anti-oxidant response of *Cucumis sativius* L. to fungicide carbendazim. Pesticide Biochemistry and Physiology 89: 54–59.