نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۳۸۶-۳۷۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 377-386
ISSN: 2008 - 4730

بررسی اثر تیمار گرمائی و قارچ‌کش بر کنترل آلودگی کشت درون شیشه‌ای سوخ نرگس (*Narcissus tazetta* L.)

سیده مهدیه خرازی[۱]- علی تهرانی فر[۲*]- احمد شریفی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۱

چکیده

موفقیت در تکنیک کشت بافت، به خصوص در رابطه با گیاهان سوخ‌دار، به میزان کنترل آلودگی میکروبی در طی دوره کشت وابسته می‌باشد. اعمال تیمارهای مختلف نظیر تیمار گرمایی و کاربرد قارچ‌کش‌های مختلف می‌تواند به کنترل آلودگی میکروبی و به دنبال آن، افزایش درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها کمک نماید. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تیمار گرمایی و کاربرد قارچ‌کش بنومیل بر کاهش آلودگی کشت درون شیشه‌ای گیاه نرگس، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۲ عامل شامل غلظت قارچ‌کش بنومیل در محیط کشت (یک و دو در هزار)، اعمال و یا عدم اعمال تیمار گرمایی (۲ سطح) با ۱۰ تکرار انجام شد. به منظور اعمال تیمار گرمایی از آب گرم ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده گردید. از محیط کشت پایه MS تکمیل شده با تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) برای کشت ریزنمونه های فلس جفتی استفاده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد با وجود آنکه کمترین درصد آلودگی در شرایط اعمال تیمار گرمایی و کاربرد دو گرم در لیتر بنومیل حاصل شد، ولی با این حال بیشترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نیز در این تیمار مشاهده شد که منجر به کاهش پتانسیل باززایی ریزنمونه ها شد. لذا با در نظر گرفتن درصد قهوه‌ای شدن، درصد باززایی و درصد آلودگی ریزنمونه‌ها، عدم اعمال تیمار گرمایی و کاربرد محیط کشت حاوی یک گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل جهت کشت ریزنمونه‌های فلس جفتی گیاه نرگس توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: بنومیل، درصد زنده‌مانی، درصد قهوه‌ای شدن، کشت بافت

مقدمه

پیشگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت گیاهی برای موفقیت کار از عوامل حیاتی محسوب می‌شود. آلودگی ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها از مهم‌ترین عوامل از بین رفتن گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شوند. از جمله این میکروارگانیسم‌ها باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها می‌باشند (۴). این میکروارگانیسم‌ها با گیاهان کشت شده بر سر تغذیه رقابت می‌کنند و با افزایش تراکم و تولید ترکیبات سمی سبب افزایش مرگ و میر، نوسان در رشد، نکروز بافت، کاهش شاخه‌زایی و ریشه‌دهی و به طور کلی سبب کاهش بازده تولید و حتی بازدارندگی کامل از رشد می‌گردند (۸، ۹ و ۲۲). ضدعفونی ریزنمونه یکی از مراحل بسیار مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بر روی ریزنمونه‌ها طی مراحل کشت بافت می‌باشد. به همین علت بهبود روش‌ها و تحقیق در رابطه با شرایط ضدعفونی در کشت درون شیشه‌ای از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است. در واقع، موفقیت پروتوکل‌های کشت بافت گیاهی وابسته به ضدعفونی ریزنمونه است (۲۲). طی انجام ضدعفونی، مواد زنده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست دهند و تنها باید آلودگی حذف گردد. بنابراین باید غلظت مواد مورد استفاده و مدت زمان اعمال تیمارهای مورد نظر به طور متعادل با توجه به نوع ریزنمونه تعیین گردد (۹). اندام‌هایی نظیر ریزوم، استولون و سوخ که زیر خاک تشکیل می‌گردند، علائم شدید آلودگی را طی مراحل کشت بافت از خود نشان می‌دهند (۱۴)، که با اعمال تیمارهایی نظیر غلظت‌های بالای مواد ضدعفونی‌کننده و یا افزایش مدت زمان اعمال تیمار ضدعفونی، می‌توان علائم آلودگی را تا حدودی کاهش داد. با این حال با اعمال چنین تیمارهایی، گاهی اوقات آلودگی در سطح بالایی مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد که قارچ‌های عامل آلودگی بدون بروز هیچگونه علائم ظاهری، در داخل

۱ و ۳- استادیاران، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی
۲- استاد، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: tehranifar2009@yahoo.com)
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.64767

بافت‌های گیاهی قرار دارند که پس از کشت، این علائم ظاهر می شوند. بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که روش‌های دیگر نظیر اعمال تیمار حرارتی جهت کنترل آلودگی داخلی بافت‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد (۱۳).

جهت کشت درون‌شیشه‌ای نرگس از قسمت‌های مختلف این گیاه به عنوان ریزنمونه استفاده شده است (۱۱). اما بهترین ریزنمونه قطعات فلس جفتی یا قطعات کوچک برش خورده سوخ می‌باشد. با این حال، آلودگی میکروبی بافت‌ها یا ارگان‌هایی که زیر زمین تشکیل می‌شوند (مانند سوخ‌ها) یک مشکل جدی برای کشت درون‌شیشه‌ای آنها می‌باشد (۲۰). با استفاده از تیمارهای شدید ضدعفونی سطحی با کمک اتانول یا هیپوکلریت سدیم و یا محیط کشت حاوی قارچ‌کش، می‌توان آلودگی را تا حدودی حذف کرد (۶). از آنجایی که آلودگی طی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای نرگس، یکی از موانع تکثیر این گیاه زینتی می‌باشد و باعث از بین رفتن تعدادی و یا گاهی تمامی کشت‌ها می‌گردد، لذا این تحقیق با هدف حذف و یا کاهش آلودگی ریزنمونه‌های گیاه نرگس به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای این گیاه زینتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد انجام شد. سوخ نرگس شهلا، (*Narcissus tazetta* L.) بعد از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه، از گلخانه‌ای در شهرستان کاشمر جمع‌آوری گردید. پس از انتقال به آزمایشگاه، به منظور ضدعفونی مواد گیاهی، ابتدا فلس‌های آسیب دیده و آلوده حذف گردیدند و سپس سوخ‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع‌شوینده رایج شستشو داده شدند تا گرد و غبار و همچنین مواد زائد دیگر از سطح آن برطرف گردد. به منظور اعمال تیمار حرارتی، پس از این مرحله سوخ‌ها به دو گروه تقسیم شدند. در گروه اول، تیمار حرارتی اعمال نگردید و در گروه دوم تیمار حرارتی ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت با استفاده از دستگاه بن‌ماری اعمال گردید. پس از این مرحله، از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه برای از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی استفاده گردید و پس از انتقال بشر حاوی سوخ‌ها به زیر هود لامینار و آبکشی با آب مقطر استریل، برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی از محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. به منظور کاهش کِشش سطحی و افزایش سطح تماس سوخ و ماده ضدعفونی‌کننده، بسته به حجم محلول، ۲ تا ۳ قطره توئین ۲۰ به محلول ضدعفونی‌کننده اضافه شد. طی مدت ضدعفونی و به منظور بهبود تماس گیاه با ماده گندزدا، محلول با دست تکان داده شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار ۳ مرتبه در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب‌مقطر استریل آبکشی گردیدند. پس از شستشو، سوخ‌ها در داخل پتری دیش روی کاغذ صافی استریل، قرار داده شدند. فلس‌های خارجی سوخ‌ها که در مواجه با ماده گندزدا آسیب دیده بودند، جدا و سوخ‌ها با استفاده از اسکالپل به صورت شعاعی به هشت قطعه مساوی برش داده شدند، به طوری که هر قطعه دارای بخشی از صفحه پایگاهی بود. سپس قطعات برش خورده به فلس‌های جفتی تقسیم شدند (شکل ۱)، به طوریکه از هر سوخ ۳۲ عدد ریزنمونه فلس جفتی بدست آمد. پس از این مرحله، ریزنمونه‌ها با استفاده از یک پنس استریل در روی محیط کشت انتقال داده شدند و با آرایش افقی روی محیط کشت استقرار یافتند. پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، درب ظروف کشت توسط فویل آلومینومی بسته شد (۱۴).

شکل ۱- ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس
Figure 1- Narcissus twin scale explants

از محیط کشت پایه MS (۱۷) تکمیل شده با تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. جهت بررسی اثر غلظت قارچ‌کش در محیط کشت بر کنترل آلودگی شرایط کشت، از قارچ‌کش بنومیل با غلظت یک در هزار و دو در هزار استفاده گردید. بدین منظور قارچ‌کش مورد نظر با غلظت مشخص تهیه گردید و جداگانه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردیدند و در زیر هود لامینار به محیط کشت افزوده شدند. همچنین در محیط کشت یاد شده ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به عنوان منبع کربوهیدرات و هشت گرم در لیتر آگار برای جامد کردن محیط کشت به کار برده شد. قبل از افزودن آگار، pH محیط کشت در ۵/۷ تنظیم شد و سپس محیط کشت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند و پس از افزودن قارچ‌کش، در ویال‌هایی به میزان ۱۵ میلی‌لیتر توزیع گردیدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز عکس‌العمل ریزنمونه‌ها (تعداد سوخک‌های تشکیل شده،

درصد باززایی ریزنمونه‌ها، درصد آلودگی باکتریایی، درصد آلودگی قارچی، درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده) مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل (۲×۲) با ۲ عامل، شامل غلظت قارچ‌کش بنومیل در محیط کشت (۲ سطح)، اعمال و یا عدم اعمال تیمار گرمایی (۲ سطح)، با ۱۰ تکرار انجام شد. آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP-8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD انجام شد و در نهایت با استفاده از برنامه Excel نمودارهای مربوط به آنها رسم گردید.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت بنومیل و تیمار گرمایی و اثرات متقابل آنها بر درصد باززایی ریزنمونه ها معنی‌دار بود (جدول ۱). افزایش غلظت بنومیل در محیط کشت و همچنین اعمال تیمار گرمایی تاثیر منفی بر باززایی ریزنمونه‌ها داشت، به طوری که بیشترین میانگین این صفت (۹۳ درصد) در ریزنمونه های کشت شده در محیط کشت حاوی یک گرم در لیتر بنومیل و شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی حاصل شد. در حالی که کاربرد تیمار گرمایی و استفاده از محیط کشت حاوی دو گرم در لیتر بنومیل منجر به کمترین درصد باززایی (۳۲ درصد) در ریزنمونه‌ها گردید (شکل ۲).

نتایج و بحث

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت قارچ‌کش و تیمار گرمایی بر کنترل آلودگی کشت درون شیشه‌ای فلس جفتی نرگس

Table 1- ANOVA (Mean Square) of fungicide concentration and heat treatment on contamination control of *Narcissus tazetta* twin scale explants *in vitro*

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	تعداد پیازچه Bulblet number	قطر پیازچه Bulblet diameter	قهوه ای شدن Browning (%)	آلودگی Contamination (%)	باززایی Regeneration (%)
غلظت قارچ‌کش Benomyl concentration (A)	1	1.22 ns	0.001 ns	5487.31 **	1775.55 **	5487.31 **
تیمار گرمائی Heat treatment (B)	1	4.90 **	0.009 ns	14231.76 **	381.30 **	14231.76 **
A × B	1	0.62 ns	0.001 ns	752.56 **	2333.25 **	752.56 **
خطا Error	36	0.698	0.009	15.34	13.35	15.34

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی دار.

**, * and ns: significant at 1%, 5% and non-significant, respectively.

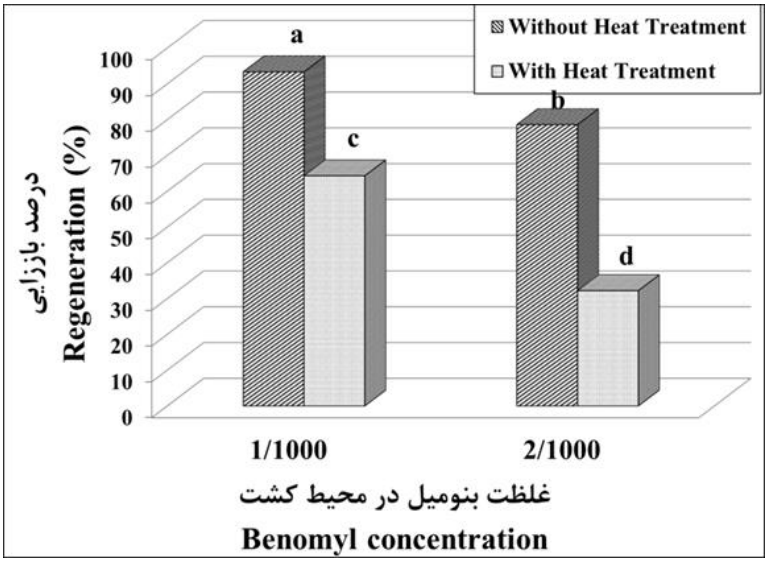
از سوی دیگر محاسبه درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نشان داد که تاثیر تیمارها بر این صفت نیز معنی‌دار بود. اعمال تیمار گرمایی و کاربرد بنومیل با غلظت دو گرم در لیتر، تاثیر شدیدی بر افزایش درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت و بیشترین میانگین در این تیمار حاصل شد، در صورتی که عدم کاربرد تیمار گرمایی و کاهش غلظت بنومیل در محیط کشت به میزان یک گرم در لیتر باعث کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردید (شکل ۳).

بر اساس نتایج به دست آمده اثر تیمار گرمایی بر تعداد سوخک باززایی شده معنی‌دار بود، به طوری که کاربرد تیمار گرمایی تأثیر منفی بر تعداد سوخک باززایی شده داشت و باعث کاهش ۲۵ درصدی این صفت در مقایسه با شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی شد. در واقع با اعمال تیمار گرمایی پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها کاهش می‌یابد که در نتیجه منجر به کاهش ۲۷ درصدی تعداد سوخک باززایی شده می گردد (شکل ۴). اندازه‌گیری قطر سوخک‌های باززایی شده نشان داد که تیمار گرمایی تأثیر معنی‌داری بر این صفت نداشت ولی با این حال در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی، سوخک‌های به نسبت قطورتری (با قطر ۰/۷۲ میلی‌متر) تشکیل گردید (شکل ۵ و شکل ۶-ب).

میزان مقاومت گیاه به تیمار گرمایی، بستگی به شرایط فیزیولوژیکی گیاه نظیر اندازه و محتوای رطوبت گیاه، قدرت رشد، وضعیت لایه‌های خارجی، میزان درجه حرارت در هنگام رشد، سطح رکود و خواب، سن و ساختار ژنتیکی گیاه دارد. در پژوهش انجام شده روی گیاه لیلیوم مشخص گردید که اعمال تیمار گرمایی ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، باعث قهوه‌ای شدن و تأخیر در باززایی ریزنمونه‌ها گردید. همچنین اعمال این تیمار تأثیر منفی بر تعداد سوخک باززایی شده داشت و درصد باززایی ریزنمونه‌ها نیز به میزان ۲۵ درصد کاهش یافت، درحالی‌که اعمال تیمارهای گرمایی ۴۰ تا ۴۴ درجه سانتی‌گراد تأثیر منفی بر میزان باززایی ریزنمونه‌ها نداشت (۱۵). لذا انتخاب دمای مناسب با توجه به میزان حساسیت بافت گیاهی جهت انتخاب صحیح تیمار گرمایی اهمیت ویژه‌ای دارد.

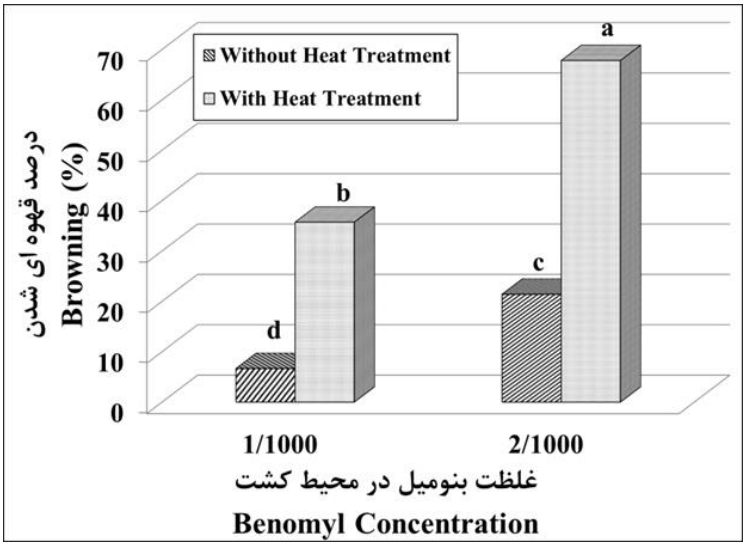
درصد آلودگی که شامل آلودگی باکتریایی و قارچی می‌باشد،

پارامتر مهمی در این پژوهش محسوب می‌گردد. نتایج مندرج در شکل ۷ نشان می‌دهد که در ریزنمونه‌های فلس جفتی کشت شده در محیط کشت حاوی ۱ گرم در لیتر بنومیل و اعمال تیمار گرمایی، بیشترین درصد آلودگی مشاهده شد که شامل ۲۱ درصد آلودگی قارچی و ۱۴ درصد آلودگی باکتریایی بود و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. از سوی دیگر، کمترین درصد آلودگی (۷ درصد) در شرایط اعمال تیمار گرمایی و محیط کشت حاوی ۲ گرم در لیتر بنومیل حاصل شد. همچنین بین غلظت‌های یک و دو گرم در لیتر بنومیل در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.



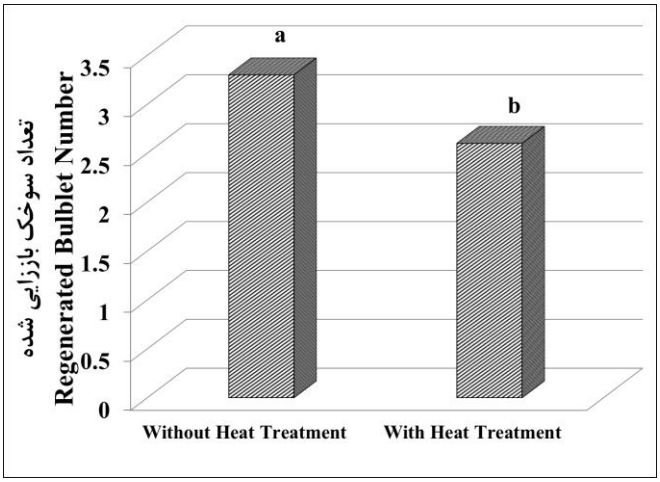
شکل ۲- اثر متقابل تیمار گرمایی × غلظت قارچ‌کش در محیط کشت بر درصد باززایی ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 2- Interaction effects of heat treatment ×fungicide concentration on regeneration (%) of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p\leq0.05$)



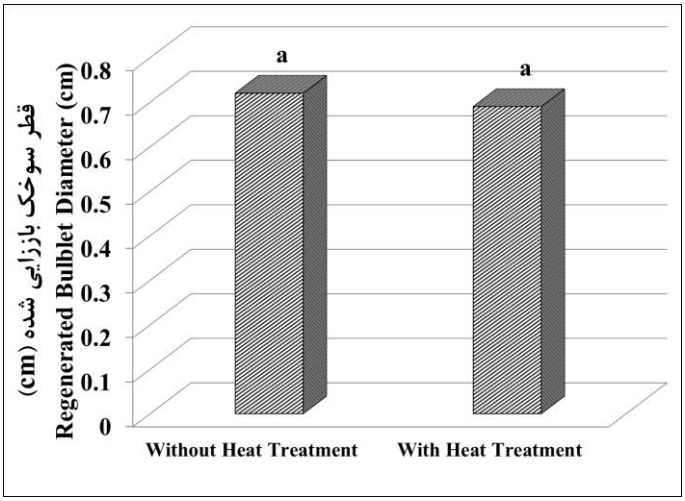
شکل ۳- اثر متقابل تیمار گرمایی×غلظت قارچ‌کش در محیط کشت بر درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 3- Interaction effect of heat treatment ×fungicide concentration on browning (%) of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p\leq0.05$)



شکل ٤- اثر تیمار گرمایی بر تعداد سوخک باززایی شده ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 4- Effect of heat treatment on regenerated bulblet number of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)

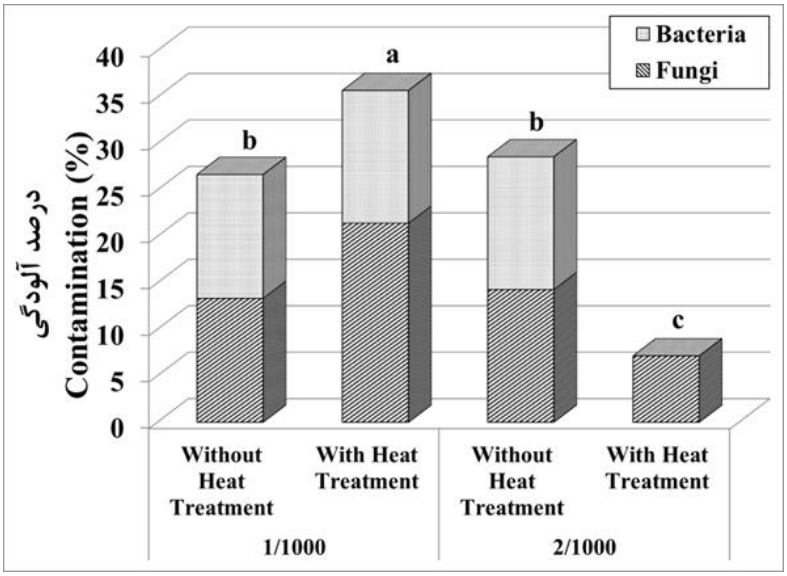


شکل ٥- اثر تیمار گرمایی بر قطر سوخک باززایی شده ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 5- Effect of heat treatment on regenerated bulblet diameter of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)

شکل ٦- الف: مراحل اولیه تشکیل سوخک از ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس، ب: سوخک‌های تشکیل شده از ریزنمونه فلس جفتی در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی

Figure 6- A: Early stages of bulblet formation from Narcissus twin scale explants. B: Bulblet formation from Narcissus twin scale explants, in the absence of heat treatments. (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۷- اثر متقابل تیمار گرمایی × غلظت قارچ‌کش در محیط کشت بر درصد آلودگی ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس

Figure 7- Interaction effect of heat treatment ×fungicide concentration on contamination (%) of Narcissus twin scale explants. (LSD, $p \leq 0.05$)

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کاربرد قارچ‌کش‌ها می‌تواند به کنترل آلودگی در شرایط کشت بافت کمک نماید (۷ و ۱۸)، و بر اساس تحقیقات انجام شده، مؤثرترین تیمار در مقابل آلودگی قارچی، قارچ‌کش بنومیل می‌باشد (۱). از آنجایی‌که این قارچ‌کش، جزو قارچ‌کش‌های سیستمیک محسوب می‌گردد، لذا جهت حذف قارچ‌های داخلی مفید می‌باشد (۱۶). اسمیت (۲۱) گزارش نمود استفاده از تیمارهای قارچ‌کش (نظیر بنومیل با غلظت ۰/۵ درصد) قبل از کشت نمونه‌ها، می‌تواند به کاهش آلودگی قارچی کمک نماید. آلتان و همکاران (۳) از تیمارهای شیمیایی مختلفی برای کنترل آلودگی میکروبی در کشت درون شیشه‌ای لیلیوم استفاده کردند و بهترین پاسخ را پس از اعمال ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بنومیل به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیستاتین به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده نمودند. نتایج مشابهی نیز توسط بارنت و مک‌گیلواری (۵) و آلن و همکاران (۲) گزارش شده است. هالدمن و همکاران (۱۰) نشان دادند کاربرد محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر بنومیل باعث حذف کامل آلودگی از ریزنمونه‌های گیاه کاملیا گردید. در محلول آبی، بنومیل به دو ترکیب متیل ۲-بنزیمیدازول کاربامات و بوتیل ایزوسیانات شکسته می‌شود که هر دو در مقابل قارچ موثر می‌باشند (۱۹). مکانیزم عمل بنومیل از طریق جلوگیری شدید از سنتز DNA و یا فرایندهای مرتبط با تقسیم سلولی قارچ‌ها می‌باشد (۱۹ و ۲۳).

مطالعات نشان می‌دهد که کاربرد تیمار گرمایی نیز می‌تواند در کنترل آلودگی میکروبی در شرایط کشت درون شیشه‌ای موثر باشد (۱۳ و ۱۵). در پژوهش انجام شده روی گیاه لیلیوم مشخص گردید که در شرایط عدم اعمال تیمار گرمایی، میزان آلودگی ریزنمونه‌های فلسی حدود ۵۰ درصد بود و اعمال تیمار گرمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت، تاثیر بسیار مطلوبی بر کاهش میزان آلودگی در شرایط کشت بافت داشت (۱۵). در رابطه با ریزنمونه‌های گیاه نرگس نیز، اعمال تیمار گرمایی ۵۴ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش آلودگی داخلی بافت‌ها از ۴۰ تا ۶۰ درصد به ۵ درصد گردید (۱۳). گاهی اوقات بعد از اعمال تیمار گرمایی، میزان آلودگی افزایش می‌یابد. در رابطه با گیاه لیلیوم، با اعمال یک ساعت تیمار گرمایی ۴۴ درجه سانتی‌گراد، میزان آلودگی نسبت به تیمار گرمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. در واقع بعد از اعمال تیمار دمایی بالا، به علت آسیب بافت‌ها، پاتوژن‌های باقی مانده ممکن است به آسانی از بافت آزاد گردند. همچنین دمای بالا، اسپور پاتوژن‌های موجود در بافت را فعال کرده و در نتیجه باعث افزایش آلودگی می‌گردد (۱۵). با توجه به اینکه مطالعات انجام شده در رابطه با تأثیر تیمار گرمایی بر روی کاهش آلودگی میکروبی ریزنمونه‌ها، محدود به سال‌های ۱۹۱۴ تا ۱۹۹۷ می‌باشد و پس از آن متوقف شده است (۱۲ و ۱۵)، لذا چنین به نظر می‌رسد که اعمال این تیمار جهت کنترل آلودگی میکروبی کارایی لازم را ندارد. در پژوهش حاضر نیز اعمال تیمار گرمایی باعث آسیب به بافت‌های فلس گردید و درصد باززایی ریزنمونه‌ها کاهش یافت.

نتیجه‌گیری

کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی، به خصوص در رابطه با گیاهان سوخدار که در تماس مستقیم با بستر کشت می‌باشند، یکی از مراحل

اساسی در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. اعمال تیمارهای مختلف از جمله تیمار گرمایی و کاربرد قارچ‌کش‌ها نظیر بنومیل در محیط کشت می‌تواند به کنترل آلودگی میکروبی سوخ نرگس شهلا کمک نمایند. با این حال اعمال چنین تیمارهایی می‌تواند تأثیر منفی بر پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها داشته باشد، لذا انتخاب تیمار مناسب به نحوی که باعث کنترل آلودگی میکروبی و از سوی دیگر حفظ پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها گردد، حائز اهمیت می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد با وجود آنکه کمترین درصد آلودگی در شرایط اعمال تیمار گرمایی و کاربرد دو گرم در لیتر بنومیل حاصل شد، ولی با این حال بیشترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نیز در این تیمار مشاهده شد که منجر به کاهش پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها شد. لذا با در نظر گرفتن درصد قهوه‌ای شدن، درصد باززایی و درصد آلودگی ریزنمونه‌ها، عدم اعمال تیمار گرمایی و کاربرد محیط کشت حاوی یک گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل جهت کشت ریزنمونه‌های فلس جفتی گیاه نرگس توصیه می‌گردد.

منابع

1- Ahmadi E., Nasr S.M.H., Jalilvand H., and Savadkoohi S.K. 2012. Contamination control of microbe *Ziziphus spina* christti seed *in vitro* culture. Trees 26(4): 1299-1304.
2- Allen T.W., Enebak S.A., and Carey W.A. 2004. Evaluation of fungicides for control of species of Fusarium on longleaf pine seed. Crop Protection 23(10): 979-982.
3- Altan F., Burun B., and Sahin N. 2010. Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. African Journal of Biotechnology 9(7): 991-995.
4- Bairu M.W., and Kane M.E. 2011. Physiological and developmental problems encountered by *in vitro* cultured plants. Plant Growth Regulation 63(2): 101-103.
5- Barnett J.P., and McGilvray J.M. 2002. Reducing seed and seedlings pathogens improves longleaf pine seedlings production. In: Gen. Tech. Rep. SRS-56. Asheville, NC: US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. 19-20.
6- Cohen D., and Whitehead H.C.M. 1987. Micropropagation of high health Narcissus and Iris. Comm. Rep. 14. Plant Physiol. Div. DSIR. Plamerston North. New Zealand.
7- Eed A.M., Reddy S.A., Reddy K.M., da Silva J.A.T., Reddy P.V., Beghum H., and Venkatsubbaiah P.Y. 2010. Effect of antibiotics and fungicides on the *in vitro* Production of *Citrus limonia* Osbeck Nodal Segment and Shoot Tip Explants. Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 4(1): 66-70.
8- Ghazi Motlagh Z., Tehranifar A., Arouei H., and Jahanbakhsh V. 2012. Investigation the effect of several essential oils and parabens on reducing the infection of media culture and growth, development of *Malus domestica* and *Chrysanthemum marifolium in vitro* condition. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
9- Goran A., Mozaffari A.A., and Ghaderi N. 2013. Investigation the effect of different antimicrobial compounds on surface sterilization of grape (*Vitis vinifera* L.) explants during *in vitro*. The sixth congress of Agricultural research findings. Kurdistan University. (In Persian)
10- Haldeman J.H., Thomas R.L., and McKamy D.L. 1987. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. HortScience 22(2): 306-307.
11- Hanks G.R. (Ed.). 2003. Narcissus and daffodil: the genus Narcissus. CRC press.
12- Hewitt T.R. 1914. Eelworms in *narcissus* bulbs. Journal of the Department of Agriculture and Technical Instruction for Ireland 14: 345-353.
13- Hol G.M.G.M., and van der Linde P.C.G. 1992. Reduction of contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 75-79.
14- Kharrazi M., Tehranifar A., Nemati H., and Bagheri A. 2016. Investigation of different methods of Amaryllis (*Hippeastrum*× *johnsonii*) culturing and propagation for increasing the proliferation rate during in vitro and greenhouse conditions. Ph.D. Dissertation. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
15- Langens-Gerrits M., Albers M., and De Klerk G.J. 1997. Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in Lilium and Acer. In Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Springer Netherlands. 219-224.
16- Mng'omba S.A., du Toit E.S., Akinnifesi F.K., and Sileshi G. 2012. Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. Intech open Access Publisher.
17- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.
18- Niedz R.P., and Bausher M.G. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 38(5): 468-471.
19- Pence V.C. 2005. *In vitro* collecting (IVC). I. The effect of collecting method and antimicrobial agents on

contamination in temperate and tropical collections. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 41(3): 324-332.
20- Sharifi A., Moshtaghi N., and Bagheri A.R. 2010. Applied Plant Tissue Culture. First Edition, Jahad-e-daneshgahi publication, Mashhad. (In Persian)
21- Smith R.H. 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
22- Taghi Zadeh M., Selgi M., and Shahrjerdi I. 2015. Antimicrobial effects of natural essential oils for surface sterilization of strawberries. Journal of Medicinal Plants 4(3): 311-318. (In Persian)
23- Vyas S.C. 1993. Handbook of systemic fungicides: compounds. Tata McGraw-Hill.

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 377-386
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۳۸۶-۳۷۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Effect of Heat Treatment and Fungicide on Controlling the Infestation of *Narcissus tazetta* L. *In Vitro* Culture

M. Kharrazi[1]- A. Tehranifar[2*]- A. Sharifi[3]

Received: 20-08-2017
Accepted: 21-01-2019

Introduction: Success in tissue culture technique, especially in bulbous plants, depends on the microbial contamination control during *in vitro* culture. Applying different treatments, such as heat treatment and usage of fungicides, can control the microbial contamination and consequently increase the percentage of explant survival.

Materials and Methods: This study aimed to investigate the effect of heat treatment and fungicide on reducing the contamination during *in vitro* culture of narcissus. So, an experiment was done as a factorial experiment in a completely randomized design with two factors, including benomyl concentration in the medium (1 and 2 g/l) and heat treatments (two levels, with and without heat treatment), with 10 replications. In order to sterilizing the plant materials, damaged and infected scales were removed firstly and then bulbs were washed for 30 minutes with running tab water and a few drops of dishwashing liquid. For applying heat treatment, bulbs were divided into two groups. In the first group, heat treatment was not applied and in the second group heat treatment 54 °C was applied for one hour using water bath. After this step, bulbs surface were sterilized by dipping in 70% ethanol for one minute and rinsed with sterile distilled water, followed by immersing in 1.5% sodium hypochlorite solution for 30 min. After sterilization with sodium hypochlorite solution, bulbs were washed three times with sterile distilled water under laminar air flow hood. After sterilization step, bulbs were cut into 32 twin scales explants and cultured in MS medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.2 mg/l NAA + benomyl (1 or 2 g/l). After 30 days, the response of explants (number of produced bulbs, percentage of explant survival, percentage of bacterial contamination, percentage of fungal contamination, percentage of browning) was evaluated. Data preparation was done in the Excel program and data analysis was done using JMP-8 software. Mean comparison of the treatments was done by LSD test and finally the charts were drawn using the Excel program.

Results and Discussion: The results showed that increasing the concentration of benomyl in the medium and applying heat treatment had negative effect on regeneration potential of explants, so that the maximum regeneration mean were observed when heat treatment was not applied for explants and medium contains 1 g/l benomyl. Using the heat treatment and application of 2 g/l benomyl in the medium leads to the lowest regeneration amount. On the other hand, evaluating the browning percentage of explants showed that the effect of treatments was significant in this trait. Applying the heat treatment and using 2 g/l benomyl in the medium had severe effect on the increasing of explant browning and the maximum mean was observed in this treatment. But reducing the benomyl concentration in the medium and none application of heat treatment caused the lowest amount of explant browning. Contamination percentage that includes bacterial and fungal contamination is an important parameter in this study. Explants that cultured in the medium containing 1 g/l benomyl and applying heat treatment showed the highest contamination percentage, which contains 21% fungal and 14% bacterial contamination. The lowest percentage of contamination was observed when heat treatment applied and medium contains 2 g/l benomyl. However, this treatment caused the highest percentage of explant browning that lead to reduction of explants regeneration potential. Researches showed that the use of fungicides can help to control tissue culture contamination and according to previous studies, benomyl is the most effective treatment against fungal infection. As benomyl is considered as a systemic fungicide, so it is useful to eliminate the internal fungus. On the other hand, there are some reports about the positive effect of heat treatment on the control of tissue culture contamination. As regards this investigations were done in 1914 to 1997 and then stopped, so it seems that application of this treatment had no sufficient efficiency for contamination control during *in vitro* condition.

1 and 3- Assistant Professors, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Iran
2- Professor, Department of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: tehranifar2009@yahoo.com)

Conclusion: Therefore, by considering the browning, regeneration and contamination percentage, non-application of heat treatment and usage of 1g/l benomyl fungicide in the medium for in vitro culture of Narcissus twin scales explants is recommended.

Keywords: Benomyl, Percentage of survival, Percentage of browning, Tissue culture