

معرفی روشی اقتصادی جهت استقرار کشت‌های عاری از پاتوژن در کشت درون شیشه‌ای زنبق (*Iris hollandica* cv. Apollo)

مینا تقی‌زاده*

دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران

*صندوق پستی: ۳۸۴۸۱۷۷۵۸۴، اراک، ایران

m-taghizadeh@araku.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۶

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵

چکیده

پاتوژن‌های درون شیشه‌ای یکی از مهمترین مشکلات در مراحل ریزازدیادی گیاهان می‌باشند، بنابراین مهمترین مرحله کشت درون شیشه‌ای گیاهان، گندزدایی است. در روش‌های متداول گندزدایی محیط کشت و مواد گیاهی از تجهیزاتی مانند اتوکلاو و مواد شیمیایی استفاده می‌شود که سبب طولانی شدن زمان این عملیات و افزایش هزینه‌ها می‌شود. این پژوهش با هدف بهینه کردن گندزدایی ریزنمونه‌های فلس پیاز زنبق با استفاده از اسانس‌های مختلف گیاهی (آویشن، زیره و مرزه) و روش‌های کاربرد اسانس به‌عنوان ماده گندزدا، کاربرد اسانس در محیط کشت و کاربرد اسانس به‌صورت تدخینی در قالب آزمایش‌های مجزا انجام گرفت. کاربرد اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه به‌طور کامل آلودگی‌های محیط کشت و همچنین آلودگی‌های ریزنمونه را مهار کرد. بهترین روش جهت گندزدایی زمانی بود که اسانس‌ها به‌صورت ترکیبی در محیط کشت استفاده شد. در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد اسانس آلودگی باکتری کنترل شد ولی در غلظت ۰/۲۵ منجر به کنترل بهتر آلودگی‌های قارچی ریزنمونه‌های فلسی زنبق شد. میزان قهوه‌ای شدن در روش کاربرد غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اسانس در محیط کشت و در غلظت ۰/۱۲۵ درصد در تمام روش‌های کاربرد نسبت به شاهد کاهش قابل توجهی داشت. تکنیک معرفی شده در این پژوهش می‌تواند به‌میزان زیادی هزینه مصرف انرژی الکتریکی و روشنایی و هزینه پرسنلی را کاهش دهد. بنابراین با استفاده از این روش می‌توان یک تکنیک کاربردی و اقتصادی برای ریزازدیادی گیاه زنبق معرفی کرد.

کلید واژگان: آلودگی، اسانس، ریزازدیادی، صرفه اقتصادی، هیپوکلریت سدیم.

۱-مقدمه

در حال حاضر کشت درون شیشه‌ای و به‌ویژه ریزازدیادی گیاهان یکی از گسترده‌ترین کاربردهای بیوتکنولوژی است. ریزازدیادی نسبت به سایر روش‌ها، مهمترین روش استفاده شده برای ازدیاد سریع غیرجنسی گیاهان است. این روش از نظر زمان و فضای مورد نیاز برتری اقتصادی دارد و تکثیر برتر با بازده بالا و گیاهان عاری از بیماری را فراهم می‌کند. زمانی که روش‌های سنتی قادر به تامین تقاضا برای تکثیر مواد گیاهی نمی‌باشند، این روش می‌تواند در مدت زمان کوتاه میلیون‌ها گل و گیاه را با عملکرد زیاد و به‌صورت یکنواخت تولید کند [۱]. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی که در غلظت بسیار کم در گیاه تولید می‌شوند، یکی از مهمترین عوامل موثر در تنظیم تقسیم، رشد و تمایزیابی سلول‌های گیاهی هستند. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر، پرکاربردترین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در کشت سلول، بافت و اندام گیاهی بوده و نقش بسیار مهمی در استقرار و رشد درون شیشه‌ای ریزنمونه‌ها دارند. با این حال، نوع و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی مورد نیاز برای رشد مطلوب درون شیشه‌ای بسته به گونه گیاهی، ژنوتیپ و نوع ریزنمونه مورد استفاده، متفاوت است [۲]. تاکنون پژوهش‌چندانی مبنی بر تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر میزان آلودگی‌های درون شیشه‌ای در دسترس نمی‌باشد. در پژوهشی ارتباط بین حضور توفوردی و بنزیل آدنین در محیط کشت کلم زیتتی با میزان ظهور و گسترش میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا گزارش کردند [۳]. پاتوژن‌های درون شیشه‌ای از مشکلات بسیار جدی در فرایند ریزازدیادی است [۴]. مواد گندزدای مختلفی مانند هیپوکلریت سدیم (۱۰ تا ۷۰ درصد)، اتانول (۷۰ درصد) و کلرید جیوه در غلظت و زمان‌های متفاوت از چند ثانیه تا چندین دقیقه با توجه به بافت گیاهی برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها به‌کار برده شده است [۵]. در ازدیاد

درون شیشه‌ای گیلان وحشی، گزارش شده است که کاربرد هیپوکلریت سدیم با غلظت ۱/۲۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه بهترین نتیجه گندزدایی را داده است [۶]. در مطالعه‌ای مشخص شد که ضدعفونی بذور با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه و هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت ۱۲ الی ۱۵ دقیقه موجب کنترل آلودگی‌های باکتریایی و قارچی شد [۷]. با افزایش زمان استفاده از هیپوکلریت سدیم آلودگی ریزنمونه‌ها از بین رفته و درصد آلودگی کاهش می‌یابد، البته تا جایی که به بافت‌های گیاهی آسیب وارد نشود [۸]. استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در غلظت‌های مختلف به مدت ۲۰ دقیقه [۹] و ۱۵ دقیقه [۱۰] و یک درصد به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه [۱۱] برای گندزدایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی استفاده شده است. استفاده از مواد متداول گندزدا در محیط‌های کشت درون شیشه‌ای علاوه بر افزایش درصد موفقیت کشت‌ها و زنده‌مانی نمونه‌ها ممکن است سبب ایجاد سمیت در گیاه و حتی محیط کشت شود، به‌علاوه این مواد گاهی به دلیل قیمت بالا مقرون به صرفه نبوده، همچنین در بیشتر اوقات نمی‌توانند تمامی میکروارگانیزم‌های موجود در محیط‌های کشت را کنترل کنند [۱۲]. برای سهولت در کار کشت درون شیشه‌ای و کاهش این مشکلات می‌توان از برخی مواد طبیعی و ارگانیک همچون اسانس گیاهان استفاده کرد [۱۳]. در سال‌های اخیر اسانس‌ها و عصاره‌های برخی گیاهان به‌عنوان ترکیبات ضد باکتریایی [۱۴]، ضد میکروبی [۱۵]، ضد قارچی [۱۶]، ضد ویروسی و ضد انگلی مورد استفاده قرار گرفته است [۱۷]. مطالعات زیادی در رابطه با اثرات ضدقارچی اسانس و عصاره‌های گیاهان دارویی در زمینه بیماری‌های گیاهی صورت گرفته است، طی مطالعه ای اثر قارچ‌کشی اسانس گیاه زنبان روی قارچ *F. oxysporum* کاهش معنی‌داری بر تولید زیست توده و اسپورزایی قارچ مذکور را نشان داد [۱۸]. راد و همکاران [۱۹] بیان کردند که اسانس مرزه و آویشن در مهار رشد

آلودگی های قارچی، باکتریایی و ویروسی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده کشت درون شیشه گیاه زنبق محسوب می شود. در کنار سایر ترکیبات، اسانس ها ترکیباتی هستند که می توانند خاصیت ضد عفونی کنندگی داشته باشند. هدف از این پژوهش تعدیل آلودگی های مذکور با استفاده از اسانس های سازگار و کم هزینه و تجاری سازی درون شیشه ای گیاه زنبق می باشد. این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و محیط زیست دانشگاه اراک انجام شد. برای اجرای آزمایش های مختلف در طی پژوهش پیاز زنبق رقم آپولو (*Iris hollandica cv. Apollo*) از شهرستان محلات ایستگاه تحقیقاتی گل و گیاهان زینتی تهیه شد. در طی اجرای آزمایش پیازها داخل ظروف تیره دارای پرلایت مرطوب و در داخل یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و به تدریج استفاده شدند. در زمان کشت، ریزنمونه ها از سطح رویی فلس^۲ تهیه شد و روی محیط کشت پایه MS با pH ۵/۷۵ تا ۵/۸۵، کشت و درب پتری دیش ها با نوارهای پارافیلیم مسدود شدند. سپس، ریزنمونه های کشت شده در داخل اتاقک رشد کنترل شده با دمای ۲۳±۰/۱ درجه سانتی گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. توزیع ظروف کشت شده در داخل اتاقک رشد به گونه ای بود که همه تیمارها از شرایطی محیطی یکسان برخوردار شوند.

برای استخراج اسانس گیاهان (آویشن، مرزه و زیره) از روش کلونجر استفاده شد [۲۳]. بدین صورت که مواد گیاهی را در آب غوطه ور کرده و مخلوط را جوشانده. بخار به همراه همراه بخار روغن از دیگ خارج شد و کندانسور تبدیل به مایع شد و سپس در جدا کننده مکانیکی این دو مایع از هم جدا شدند [۲۴]. در این روش دمای تقطیر در حدود ۱۰۰ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر بود [۲۵]. برای گندزدایی متداول و رایج پیازها از

قارچ آسپرژیلوس^۱ مؤثر است. مطالعات نشان داد که عصاره برخی گیاهان مانند حنا و افاقیا در ممانعت از رشد میسلیم های قارچ *F. solani* بسیار مؤثر هستند [۲۰].

زنبق بزرگترین جنس تیره Iridaceae است که شامل بیش از ۳۰۰ گونه می باشد. زنبق از جمله گیاهان علفی چند ساله است که امروزه گونه های اهلی آن کاربرد زیادی از جمله به عنوان گل های شاخه بریده، استفاده در فضای سبز و باغچه ها، حاشیه آب نماها، مردابها و حوضچه ها، کاهش بار میکروبی فاضلابها و دارای خواص دارویی فراوانی می باشد [۲۱]. تکثیر گیاهان این جنس از طریق تقسیم نیساک و پیاز جهت تولید گیاه بالغ چند سال طول می کشد و بذرها نیز بسیار هتروزیگوت و دارای خفتگی هستند [۲۲].

استفاده از روش های ازدیاد درون شیشه ای می تواند زمینه ازدیاد انبوه آن را فراهم کند. گرچه، استفاده از ریزنمونه های حاصل از اندام های ذخیره ای در گیاهان پیازی به دلیل دسترسی و قابلیت ذخیره و نگهداری آنها نسبت به سایر ریزنمونه ها ارجحیت دارد، ولی ازدیاد درون شیشه ای با استفاده از ریزنمونه های اندام های زیرزمینی با دشواری های بسیاری روبه رو است. یکی از موانع مهم در این مسیر وجود آلودگی پاتوژنی فراوان در طی کشت درون شیشه ای چنین ریزنمونه هایی می باشد که روش های گندزدایی پیچیده و هزینه برداری را می طلبد.

در روش های متداول گندزدایی محیط کشت و مواد گیاهی از تجهیزاتی مانند اتوکلاو و مواد شیمیایی استفاده می شود که سبب طولانی شدن زمان این عملیات و افزایش هزینه ها می شود. بنابراین، هدف از اجرای این پژوهش، کاربرد اسانس های گیاهی به عنوان ترکیبات سازگار با محیط زیست و نسبتاً ارزان قیمت در روش های مختلف جهت کنترل و مهار آلودگی های درون شیشه ای زنبق بود.

۲- مواد و روش ها

^۲ Adaxial

^۱ *Aspergillus parasiticus*

غلظت‌های مختلف کاربرد آویشن در محیط کشت به همراه نوع روش گندزدایی در طی این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های صفر، ۱/۵ و ۲ در صد از اسانس آویشن به محیط کشت MS دارای ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین اضافه شد. گندزدایی هم به دو روش متداول و عدم گندزدایی اعمال شد.

۲-۳ اثر اسانس‌های مختلف در محیط کشت و روش

گندزدایی در مرحله استقرار کشت زنبق

در این آزمایش اثر اسانس‌ها در محیط کشت و به‌عنوان ماده گندزدا برای بررسی میزان کنترل آلودگی‌های درون شیشه‌ای زنبق استفاده شد. بنابراین، از اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه در غلظت ۰/۵ درصد در محیط کشت MS دارای ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین استفاده شد. روش گندزدایی متداول و گندزدایی با اسانس آویشن ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه روی ریزنمونه‌ها قبل کشت اعمال شد.

۲-۴ کاربرد اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه به

روش‌های مختلف جهت کنترل آلودگی ریزنمونه

با توجه به نتایج آزمایش‌های قبل، این آزمایش برای اثر اسانس‌های مختلف در غلظت‌ها و روش‌های مختلف جهت کنترل آلودگی‌های درون شیشه‌ای و همچنین جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های فلسی زنبق طراحی شد. این آزمایش شامل سه فاکتور نوع اسانس (آویشن، زیره و مرزه)، غلظت اسانس (۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد) و روش کاربرد اسانس (محلول گندزدای ریزنمونه، کاربرد تدخینی و کاربرد در محیط کشت) بود. جهت رفع آلودگی‌ها ریزنمونه‌های فلس پیاز زنبق در محلول‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه به مدت ۲۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و پس از این مدت در محیط کشت MS دارای ۰/۱ بنزیل آدنین کشت شدند. برای اعمال روش تدخینی، درب پتری دیش‌ها کاغذهای صافی در ابعاد یکسان (۲×۲ سانتی متر مربع) چسبانده و سپس پتری دیش‌ها اتوکلاو شدند. در این

روش تقی‌زاده و همکاران [۲۶] با کمی تغییرات استفاده شد. پس از حذف تونیک پیازها زیر آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه به همراه یک قطره مایع ظرفشویی شستشوی سطحی شدند. سپس، فلس‌ها از یکدیگر جدا و به قطعات ۱×۱ برش زده شدند. برای ضدعفونی پیازها، از دو ترکیب وایتکس تجاری دارای پنج درصد ماده فعال (هیپوکلریت سدیم) و الکل ۷۰ درصد استفاده شد که طی آن پیازها در دو مرحله ضدعفونی شدند. در ابتدا ریزنمونه‌های پیازی برش داده شده را به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی شسته شدند. سپس، برای رفع آلودگی‌های سطحی، پیازها به مدت ۱۲۰ ثانیه درون الکل ۷۰ درصد (حجمی / حجمی) غوطه‌ور شده و پس از آن سه مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. در ادامه به منظور رفع آلودگی‌های درون‌زاد از وایتکس تجاری استفاده شد به طوری که پیازها را به مدت ۲۵ دقیقه درون وایتکس تجاری ۲۰ درصد (حجمی / حجمی) قرار داده و در نهایت سه مرتبه پیازها آبشویی شدند.

۲-۱ اثر روش گندزدایی و نوع تنظیم کننده رشد در

مرحله استقرار کشت زنبق

هدف از انجام این آزمایش بررسی میزان و انواع پاتوژن‌های درون شیشه‌ای فلس‌های پیاز زنبق و اثر ترکیب‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر ریزنمونه بود. در این آزمایش از محیط کشت MS دارای تنظیم کننده رشد اکسینی NAA در دو غلظت صفر و ۰/۲ و تنظیم کننده رشد سیتوکینینی BA در دو غلظت صفر و ۰/۱ جهت کشت ریزنمونه‌ها استفاده شد. برای ارزیابی میزان پاتوژن‌های زنبق، پیازها پس از برش فلس‌ها به قطعات مناسب به دو روش گندزدایی متداول و بدون هیچگونه اعمال تیمار گندزدایی کشت شدند.

۲-۲ اثر غلظت آویشن در محیط کشت و روش

گندزدایی در مرحله استقرار کشت زنبق

۲-۵ ارزیابی صفات

ارزیابی صفات به صورت روزانه انجام شد و زمان ظهور اولین آلودگی ثبت شد. در پایان روز هفتم درصد آلودگی قارچی، درصد آلودگی باکتریایی، میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها، درصد نکروز شدن و درجه نکروز شدن، زمان ظهور آلودگی و هرگونه علائم رشد و باززایی ثبت شد. درصد و درجه قهوه‌ای شدن در آزمایش چهارم و در پایان هفته اول کشت بر اساس رنگ درجه بندی شده که در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است.

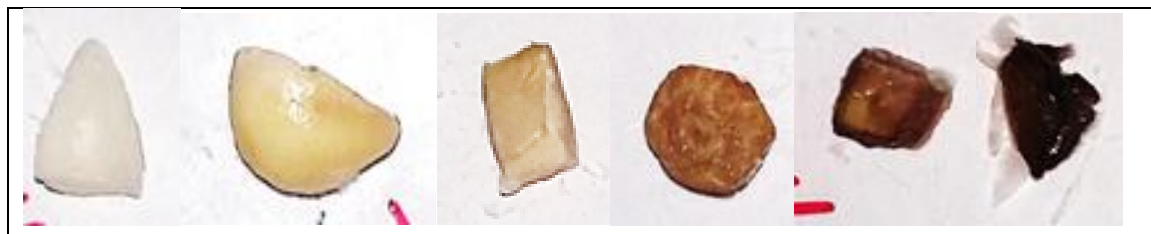
۲-۶ آنالیز داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۵ مشاهده در هر تکرار اجرا و آنالیز شد. داده‌ها ابتدا به درصد تبدیل شدند و پس از نرمال کردن داده‌های غیرنرمال با استفاده از روش لگاریتم با ANOVA و با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه شدند. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT^۱) برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری میان میانگین تیمارها انجام شد.

آزمایش به محیط کشت MS دارای ۰/۱ بنزیل آدنین ۷ گرم در لیتر آگار اضافه و بر روی دستگاه گرم کن استیرر به مدت ۴۵ دقیقه و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد حل شد (بدون اتوکلاو محیط کشت). پس از توزیع محیط کشت درون پتری‌های دارای کاغذ صافی و سرد شدن محیط کشت، ریزنمونه‌ها بدون گندزدایی (شستشو شده در زیر آب جاری) کشت شدند. پس از کشت اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد توسط سمپلر به کاغذ صافی چسبانده شده به درب پتری دیش‌ها اضافه شد. در روش کاربرد اسانس در محیط کشت، پس از تهیه محیط کشت MS دارای ۰/۱ بنزیل آدنین، اسانس‌ها در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه به محیط اضافه و توسط دستگاه گرم‌کن استیرر حل شدند. در آخر نیز آگار به محیط کشت افزوده و توسط دستگاه گرم‌کن استیرر حل شد. پس از توزیع محیط کشت و سرد شدن آن ریزنمونه‌ها کشت شدند و در ژرminatور قرار داده شدند.

جدول ۱ چگونگی درجه‌بندی ریزنمونه‌های پیازی از نظر میزان نکروز شدن

میزان نکروز شدن بر اساس رنگ ریزنمونه‌های پیازی	امتیازدهی (درجه‌بندی)
عدم نکروز (رنگ ریزنمونه سفید)	۰
خیلی کم (کریمی روشن)	۱
کم (زرد)	۲
متوسط (قهوه‌ای)	۳
زیاد (قهوه‌ای مایل به سیاه)	۴
خیلی زیاد (سیاه)	۵



شکل ۱ درجه‌بندی ریزنمونه‌های پیازی از نظر میزان نکروز شدن با توجه به رنگ ریزنمونه پس از کشت، درجه‌های ۱ تا ۵ به ترتیب از راست به چپ.

^۱ Duncan's multiple range test

۳- نتایج و بحث

۳-۱ اثر روش گندزدایی و نوع تنظیم کننده رشد در

مرحله استقرار کشت زنبق

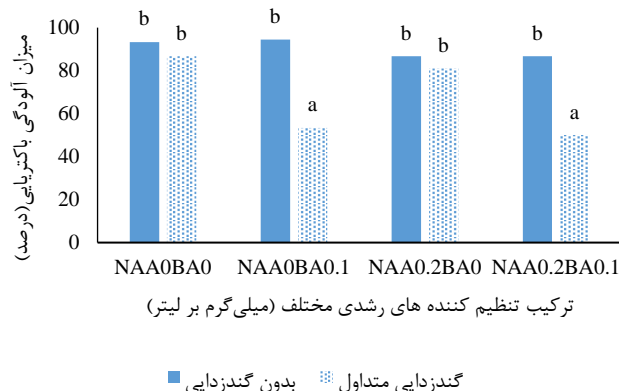
همانگونه که در جدول تجزیه واریانس نشان داده است، اثر ساده تنظیم کننده رشد و اثر متقابل روش گندزدایی در تنظیم کننده رشد به ترتیب در سطح پنج و یک درصد بر آلودگی باکتریایی و اثر ساده روش گندزدایی بر آلودگی قارچی در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که در محیط کشت های دارای ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین میزان آلودگی های باکتریایی نسبت به

سایر تیمارها کمتر بود. همچنین اعمال گندزدایی ریزنمونه ها در همه تیمارها، میزان آلودگی باکتریایی کمتری در محیط کشت نسبت به عدم گندزدایی داشت (شکل ۲). با توجه به شکل ۳، اعمال گندزدایی متداول سبب کاهش تقریباً ۵۰ درصدی آلودگی های قارچی نسبت به عدم گندزدایی بود. عارضه نامطلوبی که در تمام تیمارهای این آزمایش مشاهده شد نکروز شدن تمام فلس های کشت شده بود که در نهایت سبب مرگ و از بین رفتن کشت ها شد. اثر تنظیم کننده های رشد بر میزان آلودگی قارچی ریزنمونه ها معنی دار نبود.

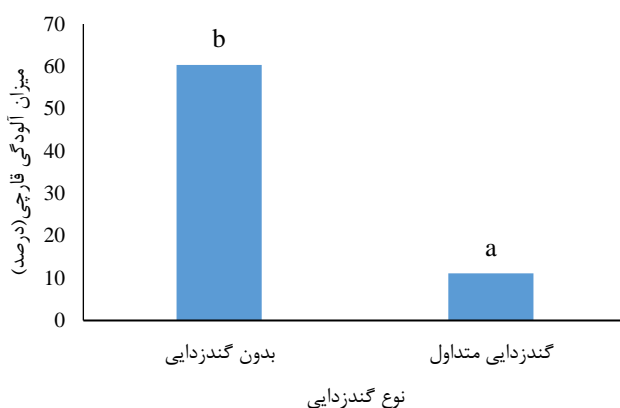
جدول ۲ تجزیه واریانس اثر نوع تنظیم کننده رشد و روش گندزدایی بر میزان آلودگی زنبق در شرایط درون شیشه ای

میانگین مربعات (MS)			
منابع تغییرات	درجه آزادی	آلودگی قارچی	آلودگی باکتریایی
نوع تنظیم کننده رشد	۳	۳۹۳ ^{ns}	۵۶۹ [*]
روش گندزدایی	۱	۱۴۵۰۴ ^{**}	۱۰۴ ^{ns}
روش گندزدایی × نوع تنظیم کننده رشد	۳	۸۱ ^{ns}	۱۵۲۰ ^{**}
خطا	۱۶	۲۲۱	۱۴۵
ضریب تغییرات (%)		۱۴	۱۵

***، ** و ns به ترتیب، معنی دار در سطح ۰/۰۱، ۰/۰۵ و عدم معنی داری



شکل ۲ اثر متقابل تنظیم کننده های رشد و گندزدایی در آلودگی باکتریایی فلس زنبق. حروف یکسان میانگین ها بین ستون نشان دهنده عدم معنی دار بودن در سطح ۱ درصد است.



شکل ۳ اثر ساده گندزدایی بر آلودگی قارچی فلس زنبق. حروف یکسان میانگین‌ها بین ستون نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد است.

نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در میزان پاتوزن‌های درون شیشه‌ای پی‌بردند که با نتایج این آزمایش مشابهت دارد. میزان شیوع آلودگی‌های درون شیشه‌ای با نوع ترکیب هورمونی محیط کشت در ارتباط بود، به گونه‌ای که در غلظت کمتر توفوردی (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به همراه غلظت بیشتر بنزیل‌آدنین (یک میلی‌گرم در لیتر) پاتوزن‌های درون شیشه‌ای کمتر مشاهده شده است [۳].

معرفی یک روش گندزدایی استاندارد مورد استفاده در تمام گونه‌های گیاهی مشکل است. در طی مراحل گندزدایی، مواد گیاهی زنده باید فعالیت زیستی خود را حفظ کنند و تنها حذف میکروارگانیسم‌ها انجام شود [۳۱]. استفاده از روش‌های گندزدایی دو مرحله‌ای برای برخی گونه‌های گیاهی مفید ارزیابی شده است. اتانول به‌طور معمول در ترکیب با هیپوکلریت سدیم اثرگذاری بیشتری دارد [۳۲] که در این آزمایش این دو ماده گندزدا تا حدودی توانست شیوع پاتوزن‌های درون شیشه‌ای را کاهش دهد که البته در حد مطلوب نبود.

۳-۲ اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن در محیط کشت و گندزدایی در مرحله استقرار کشت زنبق

نتایج این آزمایش نشان‌دهنده این مساله بود که نوع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت درون شیشه‌ای فلس پیاز زنبق در شیوع پاتوزن‌های درون شیشه‌ای موثر است. ژنوتیپ، سن و نوع ریزنمونه به دلیل تفاوت در ذخایر هیدرات‌های کربن و منابع هورمونی یکی از عوامل مهم تعیین‌کننده ریزنمونه در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد [۲۷]. در این آزمایش پاسخ ریزنمونه‌های فلسی بستگی به میزان تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت بستگی داشت. در نتایج مشابه مشاهده شد در گونه‌ای از تیره چلبائیان میزان شیوع آلودگی‌های درون شیشه‌ای با نوع ترکیب تنظیم‌کننده رشد در ارتباط بود، به گونه‌ای که در غلظت کمتر توفوردی (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به همراه غلظت بیشتر بنزیل‌آدنین (یک میلی‌گرم در لیتر) پاتوزن‌های درون شیشه‌ای کمتر مشاهده شد [۲۸]. نیکل [۲۹] در مشابه با چنین نتایجی بیان کرد که تنظیم‌کننده‌های رشد در کنترل پاتوزن‌ها از طریق تغییر در سوخت و ساز گیاهان دخالت می‌کنند. برخی از مواد اکسینی مانند اندول استیک اسید در جهت کنترل پاتوزن‌ها اثر مثبت دارند. سایر پژوهشگران نیز در طی آزمایش‌هایی برای ریزازدیادی کلم زینتی [۳] و طاووسی [۳۰] به نقش

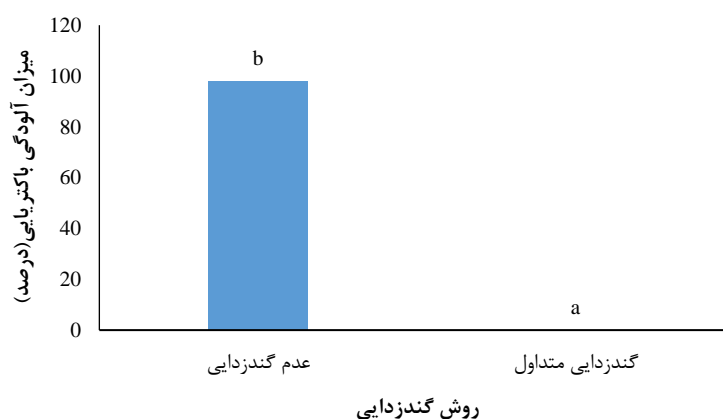
بر اساس آزمایش نتیجه آزمایش قبل، در ادامه برای همه آزمایش‌ها از بنزیل آدنین ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد که میزان آلودگی کمتری را نشان داده بود. همچنین با توجه به محتوای زیاد آلودگی‌های قارچی مواد گیاهی، از اسانس آویشن که خواص ضدقارچی دارد در این آزمایش استفاده شد. با کاربرد این اسانس، هیچگونه آلودگی قارچی مشاهده شد و نتایج تجزیه واریانس نشان داد که روش گندزدایی بر آلودگی باکتریایی در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). با کاربرد سه غلظت آویشن در

محیط کشت، هیچ نوع آلودگی قارچی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه مشاهده نشد و بنابراین اثر تیمارها بر روی این صفات نیز معنی‌دار نبود. اثر ساده گندزدایی کردن فقط بر میزان شیوع آلودگی باکتریایی معنی‌دار بود به گونه‌ای که در محیط کشت‌هایی که اسانس آویشن حضور داشت ولی ریزنمونه گندزدایی نشده بود، به میزان زیادی آلودگی باکتریایی مشاهده شد (۸۰-۱۰۰ درصد)، اما اعمال گندزدایی این میزان را به صفر کاهش داد (شکل ۴).

جدول ۳ تجزیه واریانس اثر غلظت آویشن و روش گندزدایی بر میزان آلودگی باکتریایی زنبق در شرایط درون شیشه‌ای

میانگین مربعات (MS)		
منابع تغییرات	درجه آزادی	آلودگی باکتریایی
غلظت آویشن	۲	۲۲ ^{ns}
روش گندزدایی	۱	۴۳۰۲۲ ^{**}
روش گندزدایی × غلظت آویشن	۲	۲۲ ^{ns}
خطا	۱۲	۲۲
ضریب تغییرات (%)		۹

** و ns: به ترتیب، معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و عدم معنی‌داری



شکل ۴ اثر ساده روش گندزدایی بر آلودگی باکتریایی فلس زنبق با کاربرد اسانس آویشن در محیط کشت. حروف یکسان میانگین‌ها بین ستون نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد است.

۳-۳ اثر اسانس‌های مختلف در محیط کشت و روش گندزدایی در مرحله استقرار کشت زنبق

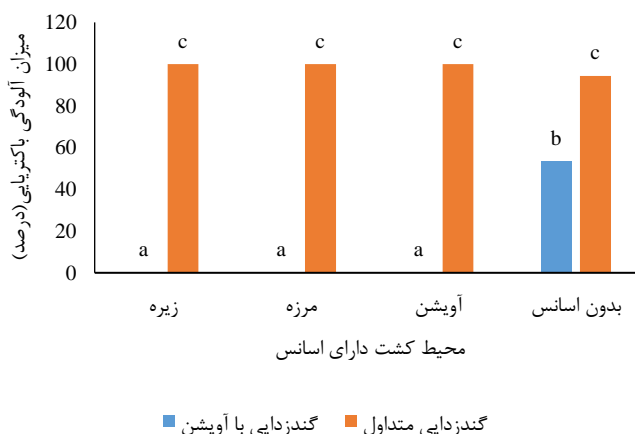
بر اساس نتایج آزمایش قبل، کاربرد آویشن در محیط کشت سبب کنترل کامل گسترش آلودگی‌های قارچی شد ولی این روش در کنترل رشد آلودگی‌های باکتریایی موثر نبود. بنابراین در این آزمایش از سایر اسانس‌ها نیز به‌صورت کاربرد در داخل محیط کشت و استفاده از آویشن به‌عنوان ماده گندزدا مواد گیاهی استفاده شد. نتایج

جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل نوع اسانس و روش گندزدایی همگی بر آلودگی باکتریایی در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). برای کنترل آلودگی باکتریایی ریزنمونه فلس پیاز زنبق از دو روش ضدعفونی متداول و گندزدایی با اسانس آویشن ۰/۵ درصد استفاده شد. سپس ریزنمونه‌ها در محیط کشت‌های دارای سه اسانس آویشن، مرزه و زیره کشت شدند. هیچگونه اثر قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد بنابراین اثر تیمارها بر این صفت معنی‌دار نبود.

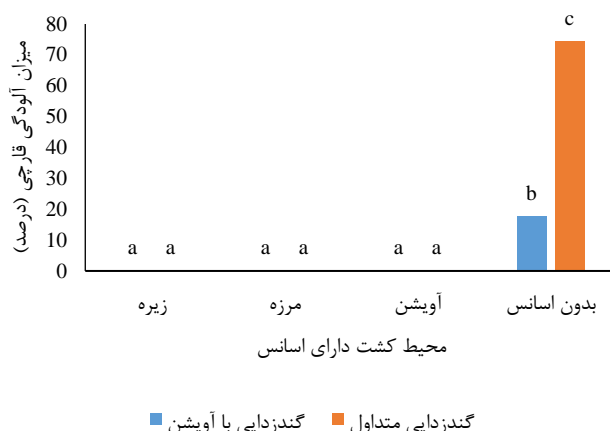
جدول ۴ تجزیه واریانس اثر نوع اسانس و روش گندزدایی بر میزان آلودگی زنبق در شرایط درون شیشه‌ای

میانگین مربعات (MS)			
منابع تغییرات	درجه آزادی	آلودگی قارچی	آلودگی باکتریایی
نوع اسانس	۳	۳۱۸۹**	۸۵۵**
روش گندزدایی	۱	۱۲۰۴**	۲۵۱۳۴**
روش گندزدایی × نوع اسانس	۳	۱۲۰۴**	۷۴۶۷**
خطا	۱۶	۵۵	۱۵
ضریب تغییرات (%)		۱۴	۷

** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



شکل ۵ اثر متقابل گندزدایی و روش کاربرد اسانس بر آلودگی باکتریایی فلس زنبق. حروف یکسان میانگین‌ها بین ستون نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد است.



شکل ۶ اثر متقابل گندزدایی و روش کاربرد اسانس بر آلودگی قارچی فلس زنبق. حروف یکسان میانگین‌ها بین ستون نشان‌دهنده عدم معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد است.

شده پرداخته می‌شود (جدول ۵). نتایج این آزمایش بیانگر آن بود که هم نوع اسانس و هم غلظت در میزان کنترل آلودگی قارچی موثر است. عدم هیچگونه آلودگی قارچی در تیمارهای کاربرد ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اسانس آویشن به دو روش تدخینی و اضافه کردن در محیط کشت، ۰/۲۵ درصد اسانس مرزه به روش تدخینی و در محیط کشت، ۰/۵ درصد اسانس مرزه با اضافه کردن در محیط کشت و ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اسانس زیره در محیط کشت مشاهده شد (جدول ۶). همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت‌های مختلف و روش کاربرد اسانس در کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه تأثیر بسزایی دارد. با توجه به جدول ۴ در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اسانس و روش کاربرد اسانس در محیط کشت آلودگی قارچی به‌طور کامل کنترل شد. هیچ گونه آلودگی باکتریایی در غلظت‌ها و روش‌های مختلف کاربرد اسانس مشاهده نشد. میزان قهوه‌ای شدن در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد اسانس و در روش کاربرد در محیط کشت (محیط کشت دارای اسانس) و در غلظت ۰/۱۲۵ درصد در تمام روش‌های کاربرد نسبت به شاهد کاهش قابل توجهی داشت (جدول ۷). مطابق نتایج آزمایش انجام شده مشخص شد که اسانس آویشن در دو روش تدخینی

اثر متقابل نوع گندزدایی و روش کاربرد اسانس بر درصد آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌ها معنی‌دار بود. به‌طوری‌که این صفت در ریزنمونه‌های گندزدایی شده با اسانس آویشن که در محیط کشت‌های دارای اسانس کشت شده بودند به میزان زیادی کنترل شده بود ولی در تیمارهایی که گندزدایی متداول صورت گرفته بود درصد آلودگی (۱۰۰ درصد) بالا بود (شکل ۵). میزان آلودگی قارچی نیز تحت تأثیر روش گندزدایی و نوع کاربرد اسانس قرار گرفت. مطابق شکل ۶، گندزدایی با اسانس آویشن سبب کنترل کامل آلودگی قارچی در محیط کشت‌های دارای هر سه اسانس شد و در محیط بدون اسانس و با گندزدایی متداول بیشترین درصد آلودگی قارچی (۷۴/۴ درصد) مشاهده شد.

۳-۴ کاربرد اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه به روش‌های مختلف جهت کنترل آلودگی ریزنمونه

بر اساس جمع‌بندی آزمایش‌های قبلی، در آزمایش نهایی روش‌های مختلف کاربرد اسانس‌های مختلف با غلظت‌های مختلف جهت به‌دست آوردن حداقل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای زنبق استفاده شد. جدول تجزیه واریانس نشان دهنده اثر عوامل مختلف بر میزان آلودگی‌ها و نکروز شدن ریزنمونه‌های زنبق در شرایط درون شیشه‌ای است که در ادامه صرفاً به اثرات متقابل معنی‌دار

و محیط کشت دارای اسانس بهترین تأثیر را بر کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی و میزان و شدت قهوه‌ای شدن داشت. اسانس مرزه و زیره به‌صورت کاربرد در محیط کشت (در روش محیط کشت دارای اسانس) بیشترین تأثیر را در کنترل آلودگی و قهوه‌ای شدن نشان دادند (جدول ۸).

جدول ۵ تجزیه واریانس اثر نوع، غلظت اسانس و روش گندزدایی بر میزان آلودگی و نکروز شدن زنبق در شرایط درون شیشه‌ای

میانگین مربعات (MS)						
منابع تغییرات	درجه آزادی	آلودگی قارچی	آلودگی باکتریایی	زمان ظهور آلودگی	میزان نکروز شدن	درجه نکروز
نوع اسانس	۲	۱۰۲۴*	۰/۰۴ ^{NS}	۰/۴*	۱۱**	۰/۳**
غلظت	۲	۶۱۸۲۰**	۷/۳*	۲/۳*	۶۱**	۱/۸**
روش گندزدایی	۲	۲۶۴۵۹**	۸/۲*	۱۵*	۹۹**	۲/۴**
غلظت × نوع اسانس	۴	۵۴۴*	۰/۶ ^{NS}	۰/۱ ^{NS}	۱۹**	۰/۴**
روش × نوع اسانس	۴	۹۲۱*	۰/۳ ^{NS}	۰/۳*	۱۹**	۰/۵**
غلظت × روش	۴	۷۷۸۶**	۴/۸*	۳/۸*	۲۵**	۰/۶**
نوع اسانس × روش × غلظت	۸	۹۲۹**	۱/۷ ^{NS}	۰/۱ ^{NS}	۱۰**	۰/۲**
خطا	۸۱	۲۶۱	۱/۳	۰/۰۹	۱/۳	۰/۰۵
ضریب تغییرات (%)		۳۰	۱۳	۱۹	۲۲	۲۴

***، ** و * به ترتیب، معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۵ در سطح معنی‌داری

جدول ۶ اثر نوع و غلظت اسانس و روش گندزدایی بر کنترل آلودگی قارچی و قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های فلسی زنبق

نوع اسانس	غلظت اسانس (درصد)	روش کاربرد اسانس	آلودگی قارچی (درصد)	قهوه‌ای شدن ریزنمونه (درصد)	شدت قهوه‌ای شدن (کد)
آویشن	۰/۱۲۵	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۱۰۰i	۰a	۰a
	۰/۱۲۵	کاربرد تدخینی اسانس	۱۰۰۰i	۰a	۰a
	۰/۱۲۵	کاربرد اسانس در محیط کشت	۱۰۰۰i	۰a	۰a

۲۲۴e	۶۶/۸g	۳۰۲۵d	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۲۵	
۰a	۰a	۰a	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۲۵	
۰a	۰a	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۲۵	
۲/۲۵f	۲۴/۷b	۸۷/۵۱۵g	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۵	
۰a	۰a	۰a	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۵	
۰a	۰a	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۵	
۰a	۰a	۱۰۰i	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۱۲۵	
۰a	۰a	۱۰۰i	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۱۲۵	
۰a	۰a	۱۰۰i	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۱۲۵	
۰a	۰a	۱۰۰i	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۲۵	
۰/۷۵۱۶c	۰a	۰a	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۲۵	
۰a	۰a	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۲۵	
۱/۵d	۲۷/۴b	۸۸/۷۱۳h	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۵	مرزه
۲/۵g	۳۲/۳c	۱۱۲۲b	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۵	
۰a	۰a	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۵	
۰a	۰a	۱۰۰i	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۱۲۵	
۰a	۰a	۱۰۰i	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۱۲۵	
۰a	۰a	۱۰۰i	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۱۲۵	
۲/۷۵h	۸۷/۵h	۴۵/۸f	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۲۵	
۲/۲۵f	۲۴/۱b	۳۵/۶e	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۲۵	
۰a	۳۹f	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۲۵	
۳i	۰a	۱۰۰j	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۵	
۰/۵b	۰a	۲۰c	کاربرد تدخینی اسانس	۰/۵	
۰a	۰a	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	۰/۵	
۴/۲۵	۱۰۰	۱۰۰	شاهد (بدون هیچگونه گندزدایی)		زیره
۳/۷۵	۱۰۰	۱۰۰	شاهد (گندزدایی متداول)		

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۷ اثر غلظت اسانس و روش گندزدایی بر کنترل آلودگی قارچی، باکتریایی و میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های فلسی زنبق

شدت قهوه‌ای شدن (کد)	قهوه‌ای شدن (درصد)	زمان ظهور آلودگی (روز)	آلودگی باکتریایی (درصد)	آلودگی قارچی (درصد)	روش گندزدایی	غلظت اسانس (درصد)
۳۰a	۰a	۳d	۰a	۱۰۰f	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۱۲۵
۳۰a	۰a	۳d	۰a	۱۰۰f	کاربرد تدخینی اسانس	
۳۰a	۰a	۳d	۰a	۱۰۰f	کاربرد اسانس در محیط کشت	
۱/۶c	۵۱/۳e	۶e	۲/۸a	۵۸/۶d	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۲۵
۱b	۱۰/۸d	۰/۸۳b	۰a	۱۱/۹b	کاربرد تدخینی اسانس	
۳۰a	۰a	۳۰a	۰a	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	
۲/۲d	۳۰/۳b	۶e	۱۵/۹b	۹۲/۱e	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	۰/۵
۱b	۱۲/۴c	۱/۲۵c	۱/۷a	۱۰/۴c	کاربرد تدخینی اسانس	
۳۰a	۰a	۳۰a	۰a	۰a	کاربرد اسانس در محیط کشت	
۴/۲۵	۱۰۰	۲	۱۰۰	۱۰۰	شاهد (بدون هیچگونه گندزدایی)	
۳/۷۵	۱۰۰	۳	۱۰۰	۱۰۰	شاهد (گندزدایی متداول)	

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۸ اثر نوع اسانس و روش گندزدایی بر کنترل آلودگی باکتریایی و میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های فلسی زنبق

شدت قهوه‌ای شدن (کد)	قهوه‌ای شدن (درصد)	زمان ظهور آلودگی (روز)	آلودگی باکتریایی (درصد)	روش گندزدایی	نوع اسانس
۱/۴e	۳۰/۴e	۴c	۷۲/۵d	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	آویشن
۰a	۰a	۱f	۳۳/۳a	کاربرد تدخینی اسانس	
۰a	۰a	۱f	۳۳/۳a	کاربرد اسانس در محیط کشت	
۰/۵b	۹/۱b	۵/۷a	۹۶/۲۳f	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	مرزه
۱/۱d	۱۳/۵d	۱/۴e	۳۷b	کاربرد تدخینی اسانس	
۰a	۰a	۱f	۳۳/۳a	کاربرد اسانس در محیط کشت	

۱/۹f	۴۲/۱f	۵b	۸۱/۹۴e	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	زیره
۰/۹c	۹/۷c	۲/۶d	۵۱/۸c	کاربرد تدخینی اسانس	
۰a	۰a	۱f	۳۳/۳a	کاربرد اسانس در محیط کشت	
۴/۲۵	۱۰۰	۲	۱۰۰	شاهد (بدون هیچگونه گندزدایی)	
۳/۷۵	۱۰۰	۳	۱۰۰	شاهد (گندزدایی متداول)	

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

ضدعفونی در کشت درون شیشه‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است. در طی انجام مراحل گندزدایی، مواد زنده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست بدهند و تنها باید آلودگی حذف گردد، بنابراین باید غلظت مواد ضدعفونی کننده و مدت زمان کاربرد آن به‌طور متعادل با توجه به نوع ریزنمونه و عدم سمیت برای آن تعیین شود [۳۳]. باکتری‌ها و قارچ‌ها از مهمترین پاتوژن‌های مشکل ساز در کشت‌های درون شیشه‌ای هستند. عوامل بسیاری بر کارایی ضدعفونی کننده‌های شیمیایی و گندزداها تأثیر می‌گذارد. عواملی که باید در نظر گرفته شوند شامل انواع میکروارگانیسم‌های موجود، غلظت و ماهیت ضدعفونی کننده و مدت زمان تیمار می‌باشد. امروزه مقاومت باکتری‌ها و قارچ‌ها به قارچ‌کش‌ها و باکتری‌کش‌های معمول عامل محدود کننده در استریل کردن مواد گیاهی و محیط کشت است و اغلب مواد شیمیایی ضد میکروبی سمیت زیادی برای موجودات دارند و به‌تازگی علاقه زیادی به استفاده از مواد جدیدی که ایمن و مؤثر باشند، به‌وجود آمده است [۳۴]. موفقیت در ریزافزایی گیاهان وابسته به شرایط رشدی گیاه مادری در زمان جمع‌آوری نمونه و همچنین حذف آلودگی‌های داخلی و خارجی می‌باشد. قارچ‌ها و باکتری‌ها متداول‌ترین میکروارگانیسم‌های رشد یافته داخل بافت‌های گیاهی گزارش شده‌اند [۳۵]. روش‌ها و مواد زیادی برای ضدعفونی و استریل کردن ریزنمونه‌های گیاهی تاکنون گزارش شده است. استفاده از تیمارهای گندزدایی منجر به

کشت بافت گیاهی فناوری بسیار کاربردی برای ازدیاد گیاهان است. متاسفانه، بیشتر پژوهشگران امکان تأسیس آزمایشگاه کشت بافت گیاهی را به‌طور مستقل به‌دلیل هزینه زیاد تولید را ندارند. یکی از مهمترین مشکلات تجهیزات گران قیمت به‌ویژه دستگاه‌هایی برای عملیات اتوکالو و گندزدایی است. بنابراین، توسعه روش‌هایی با کاربرد مواد شیمیایی یا عصاره‌های گیاهی یا ترکیب اینها برای از بین بردن ریزموجودات به‌عنوان منابع آلاینده، برای جایگزین کردن روش اتوکالو کردن برای استقرار محیط کشت‌های عاری از پاتوژن می‌تواند یکی از بهترین پروتکل‌ها برای کشت درون شیشه‌ای گیاهان باشد. پیشگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت‌های گیاهی برای موفقیت کار از عوامل حیاتی محسوب می‌شود. آلودگی ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها از مهمترین عوامل مرگ گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای هستند. این میکروارگانیسم‌ها با گیاهان کشت شده بر سر مواد غذایی محیط کشت 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 به‌طور کلی سبب کاهش بازده تولید و حتی بازدارندگی کامل از کشت می‌شوند. ضدعفونی سطحی یکی از مراحل بسیار مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بر ریزنمونه‌ها، در طی انجام روش‌های کشت بافت است، به‌همین علت بهبود روش‌های ضدعفونی و تحقیق در مورد مواد جدید

آسیب دیواره سلولی عوامل پاتوژن می‌شود. همچنین ترکیبات گندزدا می‌تواند بر دیواره سلولی گیاهی تأثیر گذاشته و منجر به آسیب بافت‌ها و در ادامه ترشح ترکیبات فنلی شود [۳۶].

در این آزمایش مشخص شد که کاربرد هیپوکلریت سدیم ۲۰ در صد به مدت ۲۰ دقیقه همراه با اسانس تأثیر بسیار خوبی بر کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی داشته تا حدی که به‌طور کامل سبب مهار و کنترل آلودگی شده است. همچنین میزان نکروز نیز در حضور هیپوکلریت سدیم و البته اسانس در مقایسه با شاهد به‌طور کامل کنترل شد. در بررسی‌های متعددی گزارش شده که اوجینول، تیمول و کارواکرول به‌عنوان بیشترین اسانس‌های آویشن دارای اثرات آنتی میکروبی و آنتی اکسیدانتی قوی هستند. تیمول و کارواکرول به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و گروه هیدروکسیل بر روی دیواره سلول‌های میکروبی و اجزای سازنده آنها عمل می‌کنند. ویژگی مهم کارواکرول و تیمول آب‌گریزی است که آنها را قادر می‌سازد در چربی‌های غشاء دیواره و میتوکندری سلول‌های باکتری نفوذ کرده، به پروتئین‌های غشاء متصل شده، لیپوپلی ساکاریدها را آزاد کرده و در نهایت سبب اختلال در ساختمان و نفوذپذیری و از دست رفتن محتویات سلول و خروج مولکول‌ها و یون‌های حیاتی، منجر به مرگ میکروبی می‌شود [۳۷]. نوع اسانس، غلظت و زمان در معرض قرار گرفتن ریزنمونه‌ها همگی در میزان ضد میکروبی آلودگی‌های باکتریایی و قارچی موثر بود.

تا کنون گزارش‌های کمی در مورد کاربرد اسانس‌ها برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای در دسترس است. کاربردهای مختلف اسانس‌ها برای گندزدایی ریزنمونه و یا گندزدایی محیط کشت بیشتر در کنترل آلودگی‌های قارچی موثر بود تا آلودگی‌های باکتریایی. بر اساس نتایج این آزمایش مشخص شد که روش گندزدایی با اسانس‌های آویشن، مرزه و زیره در

غلظت‌ها و زمان‌های مختلف و نیز در روش‌های متفاوت کاربرد برای گندزدایی، جهت کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی و نیز قهوه‌ای شدن ریزنمونه فلسی پیاز زنبق روشی بسیار مؤثر و کارآمد بود. به‌گونه‌ای که گندزدایی نمودن ریزنمونه‌ها با اسانس و نیز کاربرد اسانس در محیط کشت آلودگی‌های باکتریایی و قارچی را تا حد زیادی کاهش و از رشد انواع آلودگی جلوگیری کرد. مطالعات نشان داده است که اسانس‌های استخراج شده گیاهی ممکن است جایگزین مناسبی برای از بین بردن میکروب‌های مقاوم باشند. همچنین عنوان شده است که اسانس‌های گیاهی یکسری مواد طبیعی هستند که علاوه بر ایمن بودن برای سلامتی بشر، با طبیعت نیز سازگار می‌باشند. علاوه بر آویشن، فعالیت ضدقارچی فلفل سیاه علیه قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *Rhizoctonia solani* و *Fusarium verticillioides* گزارش شده است [۳۸]. فعالیت آنتی باکتریایی اسانس‌هایی مانند فلفل سیاه [۳۹]، زنجبیل [۴۰]، میخک هندی [۴۱]، اسطوخودوس [۴۲]، لیمو، ترنج [۴۳] و زردچوبه [۴۴] علیه برخی پاتوژن‌های گرم مثبت و منفی نیز گزارش شده است. مشابه نتایج این تحقیق زمانی که از تیمول و کارواکرول برای گندزدایی ریزنمونه‌های گره‌ای برموداگرس استفاده شد، مشاهده شد که آلودگی‌های قارچی نسبت به آلودگی‌های باکتریایی بیشتر توسط این اسانس‌ها کنترل شد [۴۵]. اثرات اسانس‌ها به‌عنوان مواد ضدعفونی کننده در شرایط استریل محیط کشت MS و رشد گره‌های داوودی روی محیط‌های تیمار شده گزارش شده است و تکنیک جایگزینی عصاره‌هایی مانند دارچین، اسطوخودوس، لیمو و غیره را برای ضدعفونی محیط کشت به منظور جایگزینی اتوکلاو کردن محیط کشت معرفی کرده‌اند که با نتایج ما مبنی بر مهار کامل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی محیط کشت درون شیشه‌ای مشابهت دارد [۴۶].

تلاش در انتخاب نوع ماده گندزدا و زمان گندزدایی، حذف کامل آلودگی‌ها از گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای در آزمایشگاه‌های کشت بافت تحقیقاتی و تجاری بزرگ تقریباً غیر ممکن است و به طور متوسط بین ۳ الی ۱۵ درصد تلفات ناشی از آلودگی‌های درون شیشه‌ای در هر واکشت وجود دارد [۵۰]. بنابراین، یک مرحله بحرانی در کشت بافت گیاهی، ایجاد کشت‌هایی عاری از آلودگی است. هزینه‌های بالای تجهیزات یک آزمایشگاه استاندارد کشت بافت گیاهی و مواد شیمیایی مورد نیاز آن مانند تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، مواد گندزدا و غیره، از یک‌سو و تلفات ناشی از آلودگی کشت‌های درون شیشه‌ای از سوی دیگر، از جمله عوامل محدودکننده اجرای روش‌های کشت درون شیشه‌ای به ویژه در کشورهای در حال توسعه هستند که اگر این تلفات کاهش پیدا نکنند، می‌توانند پیامدهای اقتصادی زیان‌بار زیادی را به همراه داشته باشند. در نتیجه یکی از اولین مراحل در فرایند باززایی درون شیشه‌ای به‌دست آوردن مواد گیاهی عاری از آلودگی جهت کشت بافت است [۳۱]. یکی از تجهیزات مهم در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، دستگاه‌های اتوکلاو و لامینار ایرفلو است که علاوه بر هزینه زیاد جهت تامین و خرید این تجهیزات پرکاربرد، مساله مصرف بسیار زیاد انرژی الکتریکی توسط این دستگاه می‌باشد. کاربرد اسانس‌ها برای گندزدایی مواد گیاهی و محیط کشت می‌تواند استفاده از این تجهیزات را مبرا کند. همچنین تکنیک معرفی شده در این پژوهش می‌تواند به میزان زیادی هزینه مصرف انرژی الکتریکی و روشنایی و هزینه پرسنلی را کاهش دهد که در جدول ۹ میزان صرفه اقتصادی با استفاده از این روش برآورد شده است. بنابراین، با استفاده از این روش می‌توان یک تکنیک کاربردی و اقتصادی ریزازدیادی گیاهان ارزشمند به‌ویژه در کشور با محوریت جهش تولید معرفی کرد.

عوامل زیادی در اثربخشی ضدعفونی‌کننده‌ها و گندزداهای شیمیایی تأثیر می‌گذارند. عواملی مانند انواع میکروارگانیسم‌ها، غلظت و ماهیت گندزداهای مورد استفاده و طول مدت گندزدایی باید در نظر گرفته شود. در حالت ایده‌آل، مواد ضدعفونی‌کننده باید در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل میکروبی در غلظت‌های پایین مؤثر باشد [۳۴]. در ازدیاد درون شیشه‌ای برموداگراس (*Cynodon dactylon* L)، استفاده از نانوذرات نقره و اسانس‌ها به‌عنوان دو ماده ضد میکروبی آلودگی ریزنمونه‌های گره‌ای برموداگراس را به‌طور موفقیت آمیزی جلوگیری کردند [۴۵]. طبق مطالعات اسانس‌های گیاهی دارای ویژگی‌های ضد میکروبی هستند [۴۷]. برخی از مطالعات در مورد نحوه عملکرد تیمول و کارواکرول از مواد مؤثره موجود در اسانس‌های گیاهی بر روی آلودگی‌های میکروبی وجود دارد [۳۷]. در این مطالعه نیز اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی اسانس‌های آویشن، زیره و مرزه به‌خوبی نشان داده شد.

تولید و پرورش برخی گیاهان در شرایط طبیعی و مزرعه به دلیل شرایط سخت تولید، کاهش عملکرد ناشی از شیوع آفات و انواع پاتوژن‌ها و سایر عوامل، مشکل و در بعضی موارد مقرون به صرفه نیست. به همین منظور طی چند دهه اخیر استفاده از روش ازدیاد درون شیشه‌ای مورد استقبال قرار گرفته است. درحالی که روش‌های ازدیاد درون شیشه‌ای نقش مهمی در تجاری‌سازی گیاهان، ایجاد اشتغال و ارز آوری دارد؛ ولی به دلیل هزینه زیاد در بخش‌های مختلف، کمبود مهارت، تخصص و تجربه کافی، محدود شده است [۴۸]. ترکیبات محیط کشت، مواد گندزدا، تجهیزات، الکتریسیته و نیروی کارگری سبب شده که محققان در پی استفاده از ترکیبات و تجهیزات جایگزین جهت کاهش هزینه‌های کشت درون شیشه‌ای در راستای تجاری‌سازی این تکنیک جهت تولید انبوه برای همه محصولات کشاورزی شوند [۴۹]. با وجود

جدول ۹ مقایسه هزینه‌های برآورد شده در گندزدایی متداول و گندزدایی با اسانس‌ها

منابع هزینه به ازای یک لیتر محیط کشت (کشت ۵۰ عدد پلیت) در مرحله گندزدایی	ساعات/حجم مورد استفاده	برآورد هزینه در روش متداول (گندزدایی) (تومان)	برآورد هزینه در روش معرفی (شده گندزدایی) (تومان)
دستگاه اتوکلاو (۲۵۰۰ وات)	۱۵۰ دقیقه	۵۰۰-۳۰۰	۰
دستگاه لامینار ایرفلو (۳۰۰ وات)	۳۰ دقیقه	۱۲-۸	۰
هزینه روشنایی (۶ مهتابی ۶۰ وات)	۱۸۰ دقیقه	۹۰-۶۰	۰
هزینه مواد گندزدا	الکل ۷۰٪ (۰/۵ لیتر) و اینتکس ۲۰٪ (۰/۵ لیتر)	الکل: ۱۷۰۰۰ و اینتکس: ۱۰۰۰۰	۰
هزینه شستشو	آب مقطر (۲ لیتر)	۲۰۰۰۰	۰
هزینه دستمزد پرسنل کارشناس ارشد	۱۸۰ دقیقه	۴۶۵۰۰	۰
هزینه‌های حاصل از استخراج اسانس‌های مورد استفاده برای کل آزمایش‌ها	۱۰ میلی لیتر	۴۰۰۰۰	۰
صرفه اقتصادی بر اساس روش گندزدایی این پژوهش (به ازای یک ساعت در مرحله گندزدایی در طی تابستان سال ۱۳۹۹)		۵۴۰۰۰ تومان	

۴- نتیجه گیری

در بین اسانس‌های مورد استفاده جهت مرحله گندزدایی کشت درون شیشه‌ای فلس‌های زنبق، آویشن جهت کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای به‌ویژه آلودگی‌های قارچی نتیجه مطلوب‌تری داشت ولی در کنترل آلودگی‌های باکتریایی عملکرد این سه اسانس تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند. اسانس‌های مرزه و زیره زمان ظهور آلودگی‌ها را نسبت به آویشن به تعویق انداختند. آویشن و مرزه قهوه‌ای شدن بیشتر ریزنمونه‌ها را نسبت به زیره شدند. آلودگی‌های باکتریایی در غلظت‌های ۰/۱۲۵ تا ۰/۲۵ درصد بیشتر کنترل شدند ولی غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس‌ها سبب کنترل بهتر آلودگی‌های قارچی شد. در غلظت ۰/۱۲۵ کمترین میزان عارضه قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های فلسی زنبق مشاهده شد. بر اساس نتایج به

دست آمده استفاده از اسانس‌ها در محیط کشت سبب کنترل بهتر آلودگی‌های قارچی و باکتریایی ریزنمونه‌ها و همچنین کمترین عارضه قهوه‌ای شدن ریزنمونه در طی کشت شد. بنابراین بر مبنای نتایج این پژوهش می‌توان استفاده از اسانس‌های گیاهی را به‌عنوان یک روش کارآمد و به‌صرفه اقتصادی، با حداقل آلودگی‌ها و پدیده نامطلوب قهوه‌ای شدن برای گندزدایی ریزنمونه‌های فلسی زنبق پیشنهاد کرد.

آنچه در کشت درون شیشه‌ای زنبق به‌ویژه از طریق قطعات فلسی از اهمیت بالایی برخوردار است و در طی انجام آزمایش‌ها بنابر تحقیقات قبلی مشکل ساز است و از پیشرفت مراحل باززایی جلوگیری می‌کند، آلودگی در محیط‌های کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. اسانس‌ها از جمله ترکیباتی هستند که می‌توانند با اثرات ضدقارچی، ضدباکتری و ضدویروس این مشکل را کاهش دهند.

Sciences (Food Industry Sciences), 29(4): 601-609.

[8] Amiri, A., Taghizadeh, M., Shoor, M., Nemati, S.H., Tehranifar, A. (2014). Investigation in vitro regeneration aspects of African violets. *Plant production technology*, 14: 1.

[9] Khan, S., Nassb, S., Ali, K. (2007). Callus induction, plant regeneration and acclimatization of African Violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. *Pakistan. Journal of Botany*, 39(4): 1263-1268.

[10] Orhayati, D., Mat Taha, Z., Azlina, Z. (2008). Studies on plant regeneration and somaclonal variation in *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African violet). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(9): 1240-1245.

[11] Mithila, J., Hall, J.C., Victor, J.M.R., Saxena, P.K. (2003). Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Reports*, 21: 408-414.

[12] Issazadeh, K.h., Massiha, A., Khoshkholgh Pahlaviani, M. 2012. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Myrtus Communis* Extract and Nystatin on Clinical Isolated and Standard Strains of *Candida Albicans*. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 2(9): 466-468.

[۱۳] تقی زاده، م.، سلگی، م. و شهرجردی، ا. (۱۳۹۳). بررسی اثر برخی اسانس های گیاهی بر کشت درون شیشه ای توت فرنگی. گزارش پایانی طرح پژوهشی، معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک.

[14] Ciavareli, L.G., Alves, E., Borges Pereira, R., José Perina, F., Magela De Souza, R. (2012). Antibacterial Activity of Essential Oils on *Xanthomonas vesicatoria* and Control of Bacterial Spot in Tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 351-359.

[15] Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. (2000). The Mode of Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree Oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88: 170-175.

[16] Ebadian, B., Confectionery, A.S., Bagheri, K., Mirsifinejad, Naeini, R. (2008). Antifungal

هدف از انجام این آزمایش ها کاهش هر چه بیشتر آلودگی ها از محیط کشت درون شیشه ای با استفاده از ترکیبات سازگار با محیط زیست و نسبتاً ارزان قیمت می باشد که در نهایت می تواند شرایط تجاری سازی گیاه زنبق را بهینه سازد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی و با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه اراک انجام شده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک تشکر و قدردانی می شود.

۵- منابع

[1] Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T., Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the twenty-first century. *Plant cell culture protocols*, 17-46.

[2] Hakim, L., Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant in vitro propagation: a comprehensive review. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing*. 1115(1): 012051.

[۳] صادقی، ا.، تقی زاده، م. و سلگی، م. (۱۳۹۴). ارزیابی مقاومت و پالایندگی کلم زیتنی نسبت به عناصر سنگین در شرایط درون و برون شیشه ای. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک.

[4] Graça Migue, M. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils. *Molecules*, 15: 9252-9287.

[5] Rout, G.R., Mohapatra, A., Jain, S.M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24(6): 531-560.

[۶] ایزدپناه، م. (۱۳۸۰). ازدیاد گیلاس وحشی *Prunus avium* از طریق کشت درون شیشه ای. پژوهش و سازندگی، ۱۴(۳): ۶۸-۷۴.

[7] Masoumi Asl, A., Aryan race, A., Dehdari, M. (2013). Investigation of direct regeneration in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and Shirazi (*Matricaria recutita* L.) under in vitro conditions. *Journal of Horticultural*

[۲۶] تقی‌زاده، م.، بابالار، م.، زمانی، ذ.، نادری، ر.، و عسکری، م. (۱۳۸۵). باززایی مستقیم و غیرمستقیم *Tulipa gesneriana* L. شاخساره نابجا در لاله زینتی رقم Apeldoorn به روش کشت درون شیشه‌ای. فصلنامه علوم کشاورزی ایران، ۳۷(۶): ۱۰۳۱-۱۳۰۹.

[27] Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R.A., Hensgens, L. (1994). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plants cell, tissue and organ culture*, 36: 259- 264.

[28] Chamandoosti, F., Afshari, A. H. (2012). Somaclonal variation in resistance of canola (*Brassica napus* L.) to sclerotinia stem root. *International journal of Agronomy and Plant Production*, 3 (12): 613-617.

[29] Nickell, L.G. (1982). Plant growth regulators, agricultural uses. Springer –Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

[۳۰] گنجی، م.، تقی‌زاده، م.، خدیوی، م. و قربان‌پور، م. (۱۳۹۵). توانایی ماده جهش‌زای EMS در مقاومت و پالایندگی درختچه زینتی طاووسی نسبت به کادمیوم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک.

[۳۱] تقی‌زاده، م. (۱۳۹۷). سترون‌سازی و تولید گیاهان عاری از پاتوژن در کشت درون شیشه‌ای. انتشارات دانشگاه اراک. ۹۲ صفحه.

[32] Oyebanji, O.B., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N.B., Idris, M.S., Nnodi, M.N., Afolabi, A.S., Ogbadu, G.H. (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20): 5395-5399.

[۳۳] گوران، ع.، مظفری، ع.ا. و قادری، ن. (۱۳۹۲). بررسی اثر ترکیبات مختلف ضد میکروبی روی ضد عفونی سطحی ریزنمونه انگور *Vitis vinifera* L. در شرایط درون شیشه‌ای. ششمین همایش یافته‌های پژوهشی کشاورزی، دانشگاه کردستان ۲۵ و ۲۶ اردیبهشت.

[34] Tung, H. T., Bao, H. G., Buu, N. Q., Chau, N. H., Nhut, D. T. (2022). The Use of Silver Nanoparticles as a Disinfectant and Media

and antimicrobial effect of a mixture of tissue improver (Tissue conditioner) with eucalyptus essential oil. *Journal of Shahid Beheshti University Dental School* 26: 2.

[17] Hedayati, A., Khosropanah, H., Bazargani, A., Abed, M., Emami, A. (2013). Assessing the Antimicrobial Effect of the Essential Oil of *Myrtus Communis* on the Clinical Isolates of *Porphyromonas Gingivalis*. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 8(4): 165.

[18] Siripornvisal, S. (2010). Antifungal activity of Ajowan oil against *Fusarium oxysporum*. *KMITL Science and Technology Journal*, 10(2): 45-51.

[19] Rad, S., Afshari, H., Hokmabadi, H., Tahmasbi, S. (2011). Study of antifungal effects of herbal essences on *Aspergillus parasiticus*, a producer of aflatoxin in Pistachio. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(20): 5155-5159.

[20] Bhardwaj, S.K. 2012. Evaluation of plant extracts as antifungal agents against *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *World Journal of Agricultural Sciences*, 8(4): 385-388.

[21] Khatib, S., Faraloni, C., Bouissane, L. (2022). Exploring the use of iris species: Antioxidant properties, phytochemistry, medicinal and industrial applications. *Antioxidants*, 11(3): 526.

[22] Kereša, S., Mihovilović, A., Čurković-Perica, M., Božena Mitić Barić, M., Vršek, I., Marchetti, S. (2009). *In Vitro* Regeneration of the Croatian Endemic Species *Iris Adriatica* Trinajstić Ex Mitić. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 51(2): 7-12.

[23] Gladikostić, N., Ikonić, B., Teslić, N., Zeković, Z., Božović, D., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Pavlić, B. (2023). Essential Oils from Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae and Lamiaceae Families Grown in Serbia: Comparative Chemical Profiling with *In Vitro* Antioxidant Activity. *Plants*, 12(4): 745.

[24] Khajenoori, M., Asl, A.H., Bidgoli, H.N. (2013). Subcritical water extraction of essential oils from *Matricaria chamomilla* L. *International Journal of Engineering-Transactions B: Applications*, 26(5): 489.

[25] Malekpoor, G.F., Pirbalouti, A., Hamedi, B. (2012). Ethnobotany and antimicrobial activity of medicinal plants of Bakhtiari Zagross mountains, Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5): 675-679.

- [43] Kirbaslar, F.G., Tavman, A., Dulger, B., Turker, G. (2009). Antimicrobial activity of Turkish Citrus peel oils. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 3207–3212.
- [44] Allawi, S. S., Auda, J. M., Hameed, H. Q., Ali, T. I. (2009). The effect of *Curcuma longa* (turmeric) rhizomes extracts on pathogenic bacteria in comparison with standard antibiotics. *Journal of Biotechnology Research Center*, 3: 15–20.
- [45] Taghizadeh, M., Solgi, M. (2014). The Application of Essential Oils and Silver Nanoparticles for Sterilization of Bermudagrass Explants in *in vitro* Culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(2): 131-140.
- [46] Deen, W., Thepsithar, C., Thongpukdee, A. (2013). *In Vitro* Culture Medium Sterilization by Chemicals and Essential Oils without Autoclaving and Growth of Chrysanthemum Nodes. *World Academy of Science*, 7: 1041-1044.
- [47] Durofil, A., Maddela, N. R., Naranjo, R. A., Radice, M. (2022). Evidence on antimicrobial activity of essential oils and herbal extracts against *Yersinia enterocolitica*-A review. *Food Bioscience*, 101712.
- [۴۸] نظامی، ر. و تقی زاده، م. (۱۳۹۲). کاهش هزینه های کشت درون شیشه ای با جایگزینی نمک های نانودرراستای تجاری سازی این تکنیک در ایران. همایش ملی علوم و فنون کشاورزی، دانشگاه ملایر.
- [49] Ogero, K.O., Gitonga, N.M. Mwangi, M., Ombori, O., Ngugi, M. (2012). In Vitro Micropropagation of Cassava through Low Cost Tissue Culture. *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 4(3): 205-209.
- [50] Leifert, C., Morris, C.E., Waites, W.M. (1994). Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems in vitro. *Critical reviews in plant sciences*, 13(2): 139-183.
- Additive in Plant Micropropagation. In *Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region* Singapore: Springer Singapore, 287-302.
- [35] Nwite, P. A., Ohanmu, E. O., Aisagbonhi, E. P., Obahiagbon, O., Ikhajiagbe, B. (2022). Sterilization Method for Reducing Microbial Contamination and Phenolic Compounds present in Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Leaf Culture. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 26(2): 227-231.
- [37] Souza, V. V. M. A., Almeida, J. M., Barbosa, L. N., Silva, N. C. C. (2022). Citral, carvacrol, eugenol and thymol: Antimicrobial activity and its application in food. *Journal of Essential Oil Research*, 34(3): 181-194.
- [38] Srichana, D., Phumruang, A.A., Chongkid, B. (2009). Inhibition effect of betel leaf extract on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 14(3): 74–77.
- [39] Hoque, M.M., Rattila, S., Shishir, M.A., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kawamoto, S. (2011). Antibacterial activity of ethanol extract of betel leaf (*Piper betle* L.) against some food borne pathogens. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 28(1) 58–63.
- [40] Kamazeri, T.S.A.T., Samah, O.A., Taher, M., Susanti, D., Qaralleh, H. (2012). Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aerugonosa*, *Curcuma mangga* and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(3): 202–209.
- [41] Joshi, B., Sah, G. P., Basnet B. B., Bhatt, M. R., D., Sharma, K., Subedi, J., Pandey., Malla R. (2011). Phytochemical extraction and antimicrobial properties of different medicinal plants: *Ocimum sanctum*. (tulsi), *Eugenia caryophyllata* (clove), *Achyranthes bidentata* (datiwan) and *Azadirachta indica*. (neem). *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(1): 1–7.
- [42] Hui, L., He L., Huan L., Xiaolan, L., Aiguo, Z. (2010). Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitis related bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4: 309–313.

Introduction of a cost-effective technique for establishing pathogen-free cultures in *in vitro* culture of iris (*Iris hollandica* cv. Apollo)

Mina Taghizadeh

Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and environmental science, Arak University, Arak, Iran

m-taghizadeh@araku.ac.ir

Receipt: 2023/01/06

Accepted: 2023/10/17

Abstract

Pathogen growth *in vitro* is one of the major problems in plant micropropagation, so the most important stage of *in vitro* culture of plants is disinfection of the cultures. In the common methods of disinfection, the media and plant materials, apparatus such as autoclaves and chemicals disinfectants are used, which causes the time of this process and the costs to increase. In this study, different essential plant oils (thyme, cumin, and savory) and different methods were used to disinfect *Iris hollandica* cv. Apollo scales disinfection in four independent experiments. The use of essential oils of thyme, cumin, and savory completely prevented both contamination of the culture medium and contamination of the explant. The best disinfection method was when the essential oils were used in combination with the culture medium. Bacterial contamination was better controlled at concentrations of 0.125 to 0.25%, but the concentration of 0.25% of essential oils resulted in better control of fungal infection. The least browning of iris scale explants was observed at a concentration of 0.125. The technique presented in this study can significantly reduce the cost of electricity and lighting, as well as personnel costs. Therefore, this method can introduce a practical and cost-effective technique for plant micropropagation.

Keywords: Contamination; Cost-effective; Essential oil; Micropropagation; Sodium hypochlorite