

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

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۶

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 تمایز یابی سلول‌های گیاهی هستند. اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها 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 زیتنی با میزان ظهور و گسترش میکروارگانیسم‌های 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 میکروارگانیسم‌های 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 زنیان 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

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

زنبق بزرگترین جنس تیره Iridaceae است که شامل بیش از ۳۰۰ گونه می‌باشد. زنبق از جمله گیاهان علفی چند ساله است که امروزه گونه‌های اهلی آن کاربرد زیادی از جمله به‌عنوان گل‌های شاخه بریده، استفاده در فضای سبز و باغچه‌ها، حاشیه آب نماها، مرداب‌ها و حوضچه‌ها، کاهش بار میکروبی فاضلاب‌ها و دارای خواص دارویی فراوانی می‌باشد [۲۱]. تکثیر گیاهان این جنس از طریق تقسیم نیساک و پیاز جهت تولید گیاه بالغ چند سال طول می‌کشد و بذرها نیز بسیار هتروزیگوت و دارای خفتگی هستند [۲۲].

استفاده از روش‌های ازدیاد درون شیشه‌ای می‌تواند زمینه ازدیاد انبوه آن را فراهم کند. گرچه، استفاده از ریزنمونه‌های حاصل از اندام‌های ذخیره‌ای در گیاهان پیازی به‌دلیل دسترسی و قابلیت ذخیره و نگهداری آنها نسبت به سایر ریزنمونه‌ها ارجحیت دارد، ولی ازدیاد درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های اندام‌های زیرزمینی با دشواری‌های بسیاری روبه‌رو است. یکی از موانع مهم در این مسیر وجود آلودگی پاتورنی فراوان در طی کشت درون شیشه‌ای چنین ریزنمونه‌هایی می‌باشد که روش‌های گندزدایی پیچیده و هزینه‌برداری را می‌طلبد.

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 هزینه ها می‌شود. بنابراین، هدف از اجرای این پژوهش، کاربرد اسانس‌های گیاهی به‌عنوان ترکیبات سازگار با محیط زیست و نسبتاً ارزان قیمت در روش‌های مختلف جهت کنترل و مهار آلودگی‌های درون شیشه‌ای زنبق بود.

۲- مواد و روش‌ها

آلودگی های قارچی، باکتریایی و ویروسی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده کشت درون شیشه گیاه زنبق محسوب می‌شود. در کنار سایر ترکیبات، اسانس‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند خاصیت ضدعفونی‌کنندگی داشته باشند. هدف از این پژوهش تعدیل آلودگی‌های مذکور با استفاده از اسانس‌های سازگار و کم هزینه و تجاری سازی درون شیشه ای گیاه زنبق می‌باشد. این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و محیط زیست دانشگاه اراک انجام شد. برای اجرای آزمایش‌های 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 سانتی‌گراد نگهداری شدند و به‌تدریج استفاده شدند. در زمان کشت، ریزنمونه‌ها از سطح رویی فلس^۲ تهیه شد و روی محیط کشت پایه MS با pH ۵/۷۵ تا ۵/۸۵، کشت و درب پتری دیش‌ها با نوارهای پارافیل مسدود شدند. سپس، ریزنمونه های کشت شده در داخل اتاقک رشد کنترل شده با دمای ۲۳±۰/۱ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. توزیع ظروف کشت شده در داخل اتاقک رشد به گونه‌ای 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 غوطه‌ور کرده و مخلوط را جوشانده. بخار به‌همراه همراه بخار روغن از دیگ خارج شد و کندانسور تبدیل به مایع شد و سپس در جداکننده مکانیکی این دو مایع از هم جدا شدند [۲۴]. در این روش دمای تقطیر در حدود ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر بود [۲۵]. برای گندزدایی متداول و رایج پیازها از

^۲ Adaxial

^۱ *Aspergillus parasiticus*

روش تقی زاده 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 1×1 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.

۱-۲ 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

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.

۳-۲ اثر اسانس‌های مختلف در محیط کشت و روش گندزدایی در مرحله استقرار کشت زنبق

در این آزمایش اثر اسانس‌ها در محیط کشت و به عنوان 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.

۴-۲ 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 (2×2 سانتی متر مربع) چسبانده و سپس پتری دیش‌ها اتوکلاو شدند. در این

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.

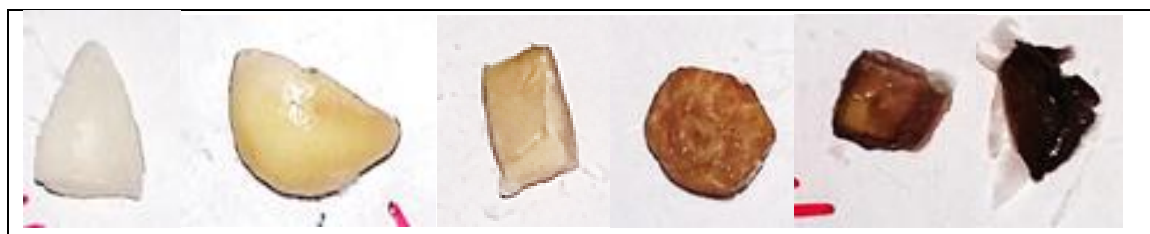
۲-۶ آنالیز داده‌ها

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 ($DMRT^1$) 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 (کرمی 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.

¹ Duncan's multiple range test

۳- نتایج و بحث

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

مرحله استقرار کشت زنبق

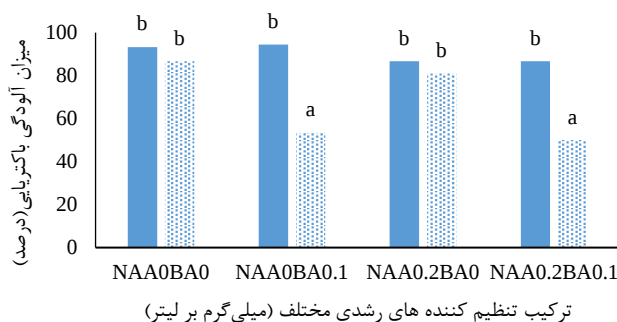
همانگونه که در جدول تجزیه واریانس نشان داده است، اثر ساده تنظیم کننده رشد و اثر متقابل روش گندزدایی در تنظیم کننده رشد به ترتیب در سطح پنج و یک درصد بر آلودگی باکتریایی و اثر ساده روش گندزدایی بر آلودگی قارچی در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که در محیط کشت های دارای ۰/۱ میلی گرم در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

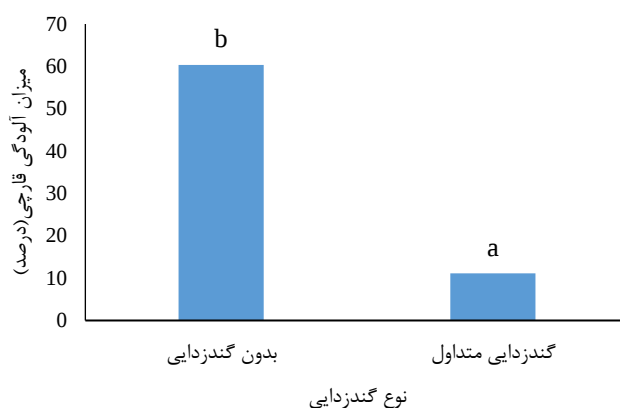
میانگین مربعات (MS)			
منابع تغییرات	درجه آزادی	آلودگی قارچی	آلودگی باکتریایی
نوع تنظیم کننده رشد	۳	۳۹۳ ^{ns}	۵۶۹*
روش گندزدایی	۱	۱۴۵۰۴**	۱۰۴ ^{ns}
روش گندزدایی × نوع تنظیم کننده رشد	۳	۸۱ ^{ns}	۱۵۲۰**
خطا	۱۶	۲۲۱	۱۴۵
ضریب تغییرات (%)		۱۴	۱۵

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



■ بدون گندزدایی ▨ گندزدایی متداول

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 تنظیم کننده‌های 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 میلی گرم در لیتر) به همراه غلظت بیشتر بنزیل آدنین (یک میلی گرم 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 به طور 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 نشان دهنده این مساله بود که نوع تنظیم کننده‌های 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 تعیین پاسخ ریزنمونه در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد [۲۷]. در این آزمایش پاسخ ریزنمونه‌های فلسی بستگی به میزان تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت بستگی داشت. در نتایجی مشابه مشاهده شد در گونه‌ای از تیره چلیپائیان میزان شیوع آلودگی‌های درون شیشه‌ای با نوع ترکیب تنظیم کننده رشد در ارتباط بود، به گونه‌ای که در غلظت کمتر توفوردی (۰/۱ میلی گرم در لیتر) به همراه غلظت بیشتر بنزیل آدنین (یک میلی گرم در لیتر) پاتوزن‌های درون شیشه‌ای کمتر مشاهده شد [۲۸]. نیکل [۲۹] در مشابه با چنین نتایجی بیان کرد که تنظیم کننده‌های 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

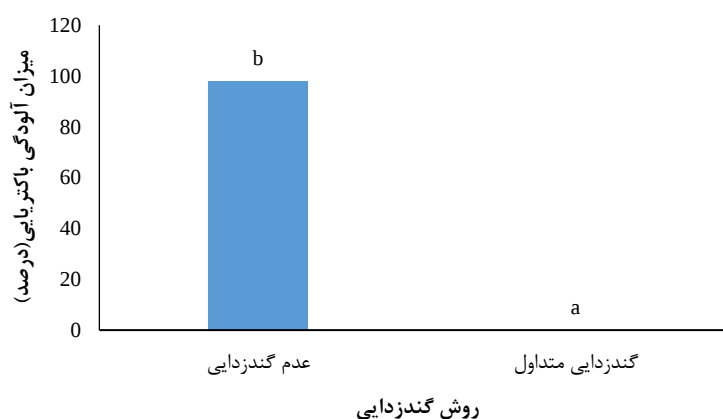
بر اساس آزمایش نتیجه آزمایش قبل، در ادامه برای همه آزمایش‌ها از بنزیل آدنین ۰/۱ میلی گرم در لیتر استفاده شد که میزان آلودگی کمتری را نشان داده بود. همچنین با توجه به محتوای زیاد آلودگی‌های قارچی مواد گیاهی، از اسانس آویشن که خواص ضدقارچی دارد در این آزمایش استفاده شد. با کاربرد این اسانس، هیچگونه آلودگی 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

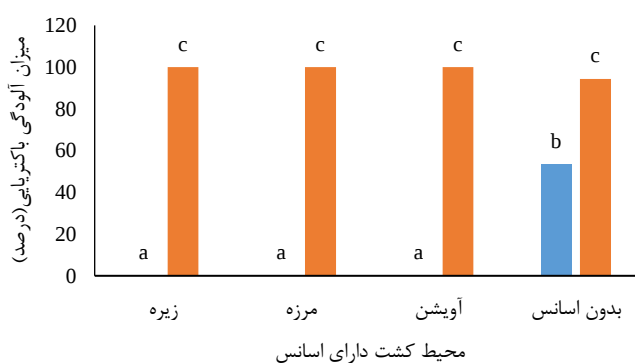
بر اساس نتایج آزمایش قبل، کاربرد آویشن در محیط کشت سبب کنترل کامل گسترش آلودگی‌های قارچی شد ولی این روش در کنترل رشد آلودگی‌های باکتریایی موثر نبود. بنابراین در این آزمایش از سایر اسانس‌ها نیز به‌صورت کاربرد در داخل محیط کشت و استفاده از آویشن به‌عنوان ماده گندزدا مواد گیاهی استفاده شد. نتایج

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

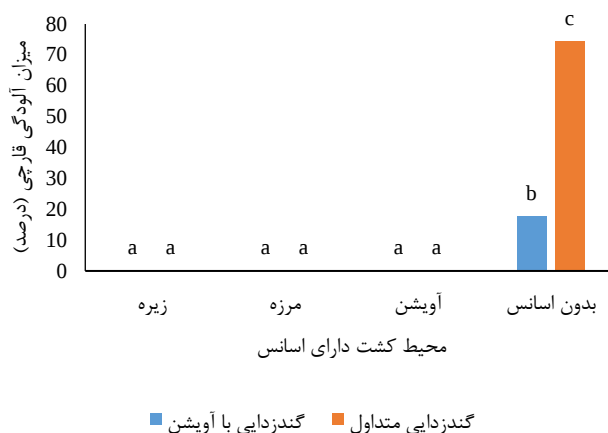
میانگین مربعات (MS)			
منابع تغییرات	درجه آزادی	آلودگی قارچی	آلودگی باکتریایی
نوع اسانس	۳	۳۱۸۹**	۸۵۵**
روش گندزدایی	۱	۱۲۰۴**	۲۵۱۳۴**
روش گندزدایی × نوع اسانس	۳	۱۲۰۴**	۷۴۶۷**
خطا	۱۶	۵۵	۱۵
ضریب تغییرات (%)		۱۴	۷

** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



■ گندزدایی با آویشن ■ گندزدایی متداول

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

*, **, NS: به ترتیب، معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، ۰/۰۵ و عدم 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

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

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

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

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

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

۱/۹f	۴۲/۱f	۵b	۸۱/۹۴e	گندزدایی ریزنمونه با اسانس	زیره
۰/۹c	۹/۷c	۲/۶d	۵۱/۸۸c	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.

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 کشت های عاری از پاتوژن می‌تواند یکی از بهترین پروتکل‌ها برای کشت درون شیشه‌ای گیاهان باشد. پیشگیری و کنترل آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت های 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 موادغذایی 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 روش های ضدعفونی و تحقیق در مورد مواد جدید

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 متداول ترین 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

آسیب دیواره سلولی عوامل پاتوژن می شود. همچنین ترکیبات گندزدا می تواند بر دیواره سلولی گیاهی تأثیر گذاشته و منجر به آسیب بافت ها 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 آلودگی های قارچی و باکتریایی داشته تا حدی که به طور کامل سبب مهار و کنترل آلودگی شده است. همچنین میزان نکروز نیز در حضور هیپوکلریت سدیم و البته اسانس در مقایسه با شاهد به طور کامل کنترل شد. در بررسی های متعددی گزارش شده که اوجینول، تیمول و کارواکرول به عنوان بیشترین اسانس های آویشن دارای اثرات آنتی میکروبی و آنتی اکسیدانتی قوی هستند. تیمول و کارواکرول به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و گروه هیدروکسیل بر روی دیواره سلول های میکروبی و اجزای سازنده آنها عمل می کنند. ویژگی مهم کارواکرول و تیمول آب گریزی است که آنها را قادر می سازد در چربی های غشاء دیواره و میتوکندری سلول های باکتری نفوذ کرده، به پروتئین های غشاء متصل شده، لیپولی ساکاریدها را آزاد کرده و در نهایت سبب اختلال در ساختمان و نفوذپذیری و از دست رفتن محتویات سلول و خروج مولکول ها و یون های حیاتی، منجر به مرگ میکروبی می شود [۳۷]. نوع اسانس، غلظت و زمان در معرض قرار گرفتن ریز نمونه ها همگی در میزان ضد میکروبی آلودگی های باکتریایی و قارچی موثر بود.

تا کنون گزارش های کمی در مورد کاربرد اسانس ها برای ضد عفونی ریز نمونه ها در شرایط درون شیشه ای در دسترس است. کاربردهای مختلف اسانس ها برای گندزدایی ریز نمونه و یا گندزدایی محیط کشت بیشتر در کنترل آلودگی های قارچی موثر بود تا آلودگی های باکتریایی. بر اساس نتایج این آزمایش مشخص شد که روش گندزدایی با اسانس های آویشن، مرزه و زیره در

غلظت ها و زمان های مختلف و نیز در روش های متفاوت کاربرد برای گندزدایی، جهت کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی و نیز قهوه ای شدن ریز نمونه فلسی پیاز زنبق روشی بسیار مؤثر و کارآمد بود. به گونه ای که گندزدایی نمودن ریز نمونه ها با اسانس و نیز کاربرد اسانس در محیط کشت آلودگی های باکتریایی و قارچی را تا حد زیادی کاهش و از رشد انواع آلودگی جلوگیری کرد. مطالعات نشان داده است که اسانس های استخراج شده گیاهی ممکن است جایگزین مناسبی برای از بین بردن میکروب های مقاوم باشند. همچنین عنوان شده است که اسانس های گیاهی یکسری مواد طبیعی هستند که علاوه بر ایمن بودن برای سلامتی بشر، با طبیعت نیز سازگار می باشند. علاوه بر آویشن، فعالیت ضد قارچی فلفل سیاه علیه قارچ های *Rhizoctonia solani*، *Aspergillus flavus* و *Fusarium verticillioides* گزارش شده است [۳۸]. فعالیت آنتی باکتریایی اسانس هایی مانند فلفل سیاه [۳۹]، زنجبیل [۴۰]، میخک هندی [۴۱]، اسطوخودوس [۴۲]، لیمو، ترنج [۴۳] و زردچوبه [۴۴] علیه برخی پاتوژن های گرم مثبت و منفی نیز گزارش شده است. مشابه نتایج این تحقیق زمانی که از تیمول و کارواکرول برای گندزدایی ریز نمونه های گره ای برموداگرس استفاده شد، مشاهده شد که آلودگی های قارچی نسبت به آلودگی های باکتریایی بیشتر توسط این اسانس ها کنترل شد [۴۵]. اثرات اسانس ها به عنوان مواد ضد عفونی کننده در شرایط استریل محیط کشت MS و رشد گره های داوودی روی محیط های تیمار شده گزارش شده است و تکنیک جایگزینی عصاره هایی مانند دارچین، اسطوخودوس، لیمو و غیره را برای ضد عفونی محیط کشت به منظور جایگزینی اتوکلاو کردن محیط کشت معرفی کرده اند که با نتایج ما مبنی بر مهار کامل آلودگی های قارچی و باکتریایی محیط کشت درون شیشه ای مشابهت دارد [۴۶].

عوامل زیادی در اثربخشی ضد عفونی کننده ها و گندزداها و شیمیایی تأثیر می گذارند. عواملی مانند انواع میکروارگانیسم ها، غلظت و ماهیت گندزداها مورد استفاده و طول مدت گندزدایی باید در نظر گرفته شود. در حالت ایده آل، مواد ضد عفونی کننده باید در برابر طیف گسترده ای از عوامل میکروبی در غلظت های پایین مؤثر باشد [۳۴]. در ازدیاد درون شیشه ای برموداگراس (*Cynodon dactylon* L) اسانس ها به عنوان دو ماده ضد میکروبی آلودگی ریز نمونه های گره ای برموداگراس را به طور موفقیت آمیزی جلوگیری کردند [۴۵]. طبق مطالعات اسانس های گیاهی دارای ویژگی های ضد میکروبی هستند [۴۷]. برخی از مطالعات در مورد نحوه عملکرد تیمول و کارواکرول از مواد مؤثره موجود در اسانس های گیاهی بر روی آلودگی های میکروبی وجود دارد [۳۷]. در این مطالعه نیز اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی اسانس های آویشن، زیره و مرزه به خوبی 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 پاتوژن ها و سایر عوامل، مشکل و در بعضی موارد مقرون به صرفه نیست. به همین منظور طی چند دهه اخیر استفاده از روش ازدیاد درون شیشه ای مورد استقبال قرار گرفته است. درحالی که روش های ازدیاد درون شیشه ای نقش مهمی در تجاری سازی گیاهان، ایجاد اشتغال و ارز آوری دارد؛ ولی به دلیل هزینه زیاد در بخش های مختلف، کمبود مهارت، تخصص و تجربه به 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 هزینه های کشت درون شیشه ای در راستای تجاری سازی این تکنیک جهت تولید انبوه برای همه محصولات کشاورزی شوند [۴۹]. با وجود

تلاش در انتخاب نوع ماده گندزدا و زمان گندزدایی، حذف کامل آلودگی ها از گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه ای در آزمایشگاه های کشت بافت تحقیقاتی و تجاری بزرگ تقریباً غیر ممکن است و به طور متوسط بین ۳ الی ۱۵ درصد تلفات ناشی از آلودگی های درون شیشه ای در هر واکشت وجود دارد [۵۰]. بنابراین، یک مرحله بحرانی در کشت بافت گیاهی، ایجاد کشت هایی عاری از آلودگی است. هزینه های بالای تجهیزات یک آزمایشگاه استاندارد کشت بافت گیاهی و مواد شیمیایی مورد نیاز آن مانند تنظیم کننده های رشد گیاهی، مواد گندزدا و غیره، از یک سو و تلفات ناشی از آلودگی کشت های درون شیشه ای از سوی دیگر، از جمله عوامل محدودکننده اجرای روش های کشت درون شیشه ای به ویژه در کشورهای در حال توسعه هستند که اگر این تلفات کاهش پیدا نکنند، می توانند پیامدهای اقتصادی زیان بار زیادی را به همراه داشته باشند. در نتیجه یکی از اولین مراحل در فرایند باززایی درون شیشه ای به دست آوردن مواد گیاهی عاری از آلودگی جهت کشت بافت است [۳۱]. یکی از تجهیزات مهم در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، دستگاه های 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 می باشد. کاربرد اسانس ها برای گندزدایی مواد گیاهی و محیط کشت می تواند استفاده از این تجهیزات را مبرا کند. همچنین تکنیک معرفی شده در این پژوهش می تواند 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 می توان یک تکنیک کاربردی و اقتصادی ریزازدیای گیاهان ارزشمند به ویژه در کشور با محوریت جهش تولید معرفی کرد.

جدول ۹ مقایسه هزینه های برآورد شده در گندزدایی متداول و گندزدایی با اسانس ها

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 (۲۵۰ 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) وایتکس ۲۰٪ (۰/۵ لیتر)	الکل: ۱۷۰۰۰ وایتکس: ۱۰۰۰۰	۰
هزینه شستشو	آب مقطر (۲ لیتر)	۲۰۰۰۰	۰
هزینه دستمزد پرسنل کارشناس ارشد	۱۸۰ دقیقه	۴۶۵۰۰	۰
هزینه های حاصل از استخراج اسانس های مورد استفاده برای کل آزمایش ها	۱۰ میلی لیتر	۴۰۰۰۰	
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 اسانس های مورد استفاده جهت مرحله گندزدایی کشت درون شیشه ای فلس های زنبق، آویشن جهت کنترل پاتوژن های درون شیشه ای به ویژه آلودگی های قارچی نتیجه مطلوب تری داشت ولی در کنترل آلودگی های باکتریایی عملکرد این سه اسانس تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند. اسانس های مرزه و زیره زمان ظهور آلودگی ها را نسبت به آویشن به تعویق انداختند. آویشن و مرزه قهوه ای شدن بیشتر ریزنمونه ها را نسبت به زیره شدند. آلودگی های باکتریایی در غلظت های ۰/۱۲۵ تا ۰/۲۵ درصد بیشتر کنترل شدند ولی غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس ها سبب کنترل بهتر آلودگی های قارچی شد. در غلظت ۰/۱۲۵ کمترین میزان عارضه قهوه ای شدن ریزنمونه های فلسی زنبق مشاهده شد. بر اساس نتایج به

دست آمده استفاده از اسانس ها در محیط کشت سبب کنترل بهتر آلودگی های قارچی و باکتریایی ریزنمونه ها و همچنین کمترین عارضه قهوه ای شدن ریزنمونه در طی کشت شد. بنابراین بر مبنای نتایج این پژوهش می توان استفاده از اسانس های گیاهی را به عنوان یک روش کارآمد و به صرفه اقتصادی، با حداقل آلودگی ها و پدیده نامطلوب قهوه ای شدن برای گندزدایی ریزنمونه های فلسی زنبق پیشنهاد کرد.

آنچه در کشت درون شیشه ای زنبق به ویژه از طریق قطعات فلسی از اهمیت بالایی برخوردار است و در طی انجام آزمایش ها بنابر تحقیقات قبلی مشکل ساز است و از پیشرفت مراحل باززایی جلوگیری می کند، آلودگی در محیط های کشت درون شیشه ای می باشد. اسانس ها از جمله ترکیباتی هستند که می توانند با اثرات ضد قارچی، ضد باکتری و ضد ویروس 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 acclimation of African Violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. *Pakistan. Jornal 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] تقی‌زاده، م.، سلگی، م. و شهرجردی، ا. (۱۳۹۳). بررسی

اثر برخی اسانس‌های گیاهی بر کشت درون شیشه‌ای 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 آزمایش‌ها کاهش هر چه بیشتر آلودگی‌ها از محیط کشت درون‌شیشه‌ای با استفاده از ترکیبات سازگار با محیط زیست و نسبتاً ارزان قیمت می‌باشد که در نهایت می‌تواند 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 می‌شود.

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.، تقی‌زاده، م. و سلگی، م. (۱۳۹۴). ارزیابی

مقاومت و پالایندگی کلم زیتنی نسبت به عناصر سنگین در شرایط درون و برون شیشه‌ای. پایان‌نامه 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 شیشه‌ای. 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 شاخساره نابجا در لاله زینتی رقم *Tulipa gesneriana* L. Apeldoorn به روش کشت درون شیشه‌ای. فصلنامه علوم کشاورزی ایران، ۳۷(۶): ۱۳۰۹-۱۰۳۱.

[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] Oyeibanji, 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., Mihoviločić, A., Ćurković-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., Hamed, B. (2012). Ethnobotany and antimicrobial activity of medicinal plants of Bakhtiari Zagros 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 نانودر راستای 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