مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2020.126989.1347

جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۱۳۱-۱۱۵ (۱۳۹۹) شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.28.117.55.1.1576.41

بررسی اثر روش‌های مختلف ضدعفونی برای پینه‌زایی و شاخساره‌زایی موفق گز شاهی (*Tamarix aphylla*)

پروین کریمی[۱]، مینا تقی‌زاده[۲*]، موسی سلگی[۳] و علی خدیوی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

پست الکترونیک: m-taghizadeh@araku.ac.ir

۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۴

چکیده

گز شاهی (*Tamarix aphylla*) به‌عنوان بادشکن، سایه‌بان و گیاه زینتی در باغ‌ها و فضای سبز کاربرد دارد. پدیده قهوه‌ای شدن، عامل بازدارنده مهمی در مراحل مختلف ازجمله گندزدایی و باززایی گز شاهی می‌باشد. برای بهینه کردن شرایط گندزدایی و کنترل شرایط قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها، آزمایش‌هایی با مواد گندزدا و ائوجینول برای گندزدایی ریزنمونه‌های ساقه فصل جاری و یکساله اجرا گردید. در ادامه القای پینه در محیط کشت دارای دو نوع اکسین 2,4-D و NAA بررسی شد. در آزمایش سوم نیز بهینه‌سازی محیط القای شاخساره در ریزنمونه‌های فصل جاری و یکساله بررسی گردید. بهترین تیمار گندزدایی برای کنترل آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ترشح فنل از ریزنمونه‌های فصل جاری، استفاده از ترکیب ۶۰ ثانیه اتانول همراه ۱۰ دقیقه گندزدایی هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد بود. محلول‌پاشی پایه مادری با قارچ‌کش تیوفانات متیل نیز توانست به مقدار تقریبا ۵۰ درصد آلودگی قارچی را نسبت به شاهد کاهش دهد. کاربرد ۰/۰۱ درصد ائوجینول در محیط کشت به صورت تزریقی سبب کاهش آلودگی‌ها و ترشح فنل از ریزنمونه شد. غلظت یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین میزان زنده‌مانی و القای پینه را در کمترین زمان ایجاد نمود. القای شاخساره در محیط کشت دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در ریزنمونه‌های حاصل از شاخه سال جاری و یکساله انجام شد. بنابراین استفاده از مواد گیاهی جوان‌تر، محلول‌پاشی پایه مادری با قارچ‌کش، استفاده از ائوجنول ۰/۰۱ درصد در محیط کشت می‌تواند با کاهش پدیده قهوه‌ای شدن و کنترل مناسب آلودگی‌ها، ریزازدیادی درختچه گز شاهی را با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد مناسب فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: گز شاهی (*Tamarix aphylla*)، قهوه‌ای شدن، گندزدایی، ائوجینول، قارچ‌کش، ریزازدیادی.

مقدمه

گونه درختچه‌ای گز *Tamarix aphylla* L. به‌عنوان بزرگ‌ترین گونه شناخته شده در خانواده Tamaricaceae معرفی شده است. کشت گز شاهی به‌عنوان بادشکن، سایه‌بان و گیاه زینتی در باغ‌ها و فضای سبز شهری به‌دلیل خوشه‌های گل‌آذین زیبا کاربرد دارد و بر خلاف دیگر گونه‌های گز گونه مهاجم نیست (Orabi *et al.*, 2011).

پرورش گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا، تکثیر

نامحدود، کنترل شرایط محیطی، امکان دستکاری ژنتیکی مواد گیاهی درون شیشه‌ای و کاهش زمان و فضای مورد نیاز برای ازدیاد ازجمله مزایای استفاده از کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. روش کشت پینه، سوسپانسیون سلولی و ریشه مویین اغلب در تحقیقات به‌عنوان یک مدل گیاهی در مطالعات استفاده می‌شوند (Doran, 2009) . استقرار یک کشت درون شیشه‌ای موفق مستلزم حذف آلودگی‌های درون‌زاد[۱] و برون‌زاد[۲] می‌باشد. 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 نموده و تنها حذف میکروارگانیسم‌ها انجام شود. بنابراین تعیین غلظت و زمان مناسب برای استریل کردن ریزنمونه‌ها اهمیت بسیاری دارد (Nakagawara *et al.*, 1998).روش مورد استفاده در گندزدایی می‌تواند تابع عوامل مختلف گیاهی یا محیطی مانند گونه گیاهی، سن، نوع ریزنمونه، میزان سمیت عامل گندزدا، نوع آلودگی، هزینه اقتصادی و شرایط محیطی حاکم بر آن باشد (Mihaljević *et al.*, 2013). ترکیبات گندزدا برای بافت‌های گیاهی سمی می‌باشند و کاربرد غلظت مناسب، مدت زمان قرارگیری ریزنمونه در معرض عوامل گندزدا و ترتیب استفاده از این مواد باید برای به حداقل رسانیدن آسیب به بافت و حداکثر زنده‌مانی ریزنمونه‌ها بهینه‌سازی شود (Mahmoud and Al-Ani, 2016).

امروزه گزارش‌های زیادی در زمینه اثر اسانس‌ها در صنایع غذایی و کشاورزی در دسترس است. خواص ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی بیشتر برای افزایش عمر پس از برداشت محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پژوهش‌ها در زمینه کاربرد اسانس‌ها در کشت درون شیشه‌ای گیاهان به ندرت در دسترس می‌باشد. Taghizadeh و (2014) Solgiگزارش کردند که گندزدایی با اسانس‌های تیمول و کارواکرول به‌ترتیب بر روی آلودگی‌های باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌های گره‌ای چمن برموداگرس مؤثر می‌باشند و فعالیت ضد قارچی تیمول و کارواکرول بستگی به غلظت و مدت زمان تیمارها دارد. Deein و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که عصاره فلفل و میخک هندی در غلظت ۱۸ میکرولیتر در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت، اسانس دارچین در غلظت ۳۶ میکرولیتر در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت، اسانس اسطوخودوس در غلظت ۱۰۸ میکرولیتر در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت و اسانس‌های زردچوبه، لیمو و درخت چای در غلظت ۲۵۲ میکرولیتر در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت بصورت ۱۰۰ درصد در استریل کردن محیط کشت مؤثر بودند. مطالعات نشان می‌دهد فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها به دلیل دارا بودن ترکیب ائوجینول است که یکی از مهمترین ترکیبات سازنده اسانس استخراج شده از گیاه میخک[۳] می‌باشد (Chaieb *et al.*, 2007). ویژگی ضدویروسی نانو ائوجینول در طی مراحل مختلف ریزازدیادی موز در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بدون داشتن عوارض جانبی به اثبات رسیده است و کاربرد این ترکیب در محیط کشت درون شیشه‌ای سبب ایجاد گیاهچه‌های عاری از ویروس شده است (Mokbel *et al.*, 2017).

یکی از مشکلات متداول در کشت درون شیشه‌ای گیاهان، پدیده نامطلوب قهوه‌ای شدن[۴] است. به‌طوری‌که آزاد شدن یا سنتز آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز[۵] و پراکسیداز[۶] در ایجاد پدیده قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای نقش دارند و سبب اکسیداسیون ترکیبات فنلی ریزنمونه می‌شوند. درجه قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه بستگی به میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز دارد. برش بافت ریزنمونه با خروج ترکیبات محتویات واکوئل، سیتوپلاسم سبب اکسیداسیون ترکیبات فنلی در مجاورت هوا می‌شود (Ozyigit, 2008). ترکیبات فنلی اکسیده‌شده از فعالیت آنزیمی جلوگیری کرده و منجر به تیره شدن محیط کشت و

۱. Endogenous pathogen

۲. Exogenous pathogen

۳ . Eugenia caryophyllata

۴ . Browning

۵ . Polyphenoloxidase

۶ . Peroxidase

متعاقب آن قهوه‌ای و مرگ ریزنمونه می‌شود. فعالیت اکسیداتیو ترکیبات فنلی یک عامل محدودکننده رشد و باززایی در کشت‌های درون‌شیشه‌ای است (Castro *et al.*, 2016).

به‌عنوان اولین گام در بسیاری از آزمایش‌های کشت بافت، القای پینه از ریزنمونه اولیه ضروریست. پس از تشکیل پینه، می‌توان از آن برای طیفی از آزمایش‌های مختلف استفاده نمود. کشت‌های پینه برای مطالعه امتزاج پروتوپلاست، کشت سلول، گزینش سلولی، جنین‌زایی سوماتیکی، اندام‌زایی و تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شوند. به دلیل امکان باززایی گیاه و القای جنین‌زایی سوماتیکی از پینه، انگیزش پینه به‌عنوان پایه و اساس مطالعات بیوتکنولوژی گیاهیست (Ikeuchi *et al.*, 2013; Osman *et al.*, 2016). کشت درون شیشه‌ای یک ابزار ارزشمند برای مطالعه، بهبود، آزمودن و گزینش مواد گیاهی کاندید برای ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی به‌ویژه در گونه‌های چوبی است که چرخه‌های تولیدمثلی طولانی دارند. کشت پینه، یک روش مناسب را برای ارزیابی فرایندهای تحمل و سم‌زدایی در گیاهان ارائه می‌دهد (Confalonieri *et al.*, 2005). تاکنون بر اساس پژوهش‌های در دسترس، مطالعه‌ای در زمینه کشت درون شیشه‌ای گونه گز *T. aphylla* نسبت به سایر گونه‌های گز انجام نشده است. کشت درون شیشه‌ای گز گونه *T. tetrandra* در محیط کشت لیندزمایر–اسکوگ[۱] دارای تنظیم‌کننده‌های بنزیل آدنین[۲] با غلظت ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و ایندول‌استیک اسید[۳] با غلظت ۲/۱۳ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان شاخساره‌زایی در گز را در حضور نور ایجاد کرده است. همچنین حضور تنظیم‌کننده نفتالن استیک اسید[۴] به‌همراه BA یا کینتین[۵] و همچنین ۲و۴–دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید[۶] همراه با BA یا کینتین منجر به القای پینه در این گیاه گردید (Orabi *et al.*, 2011). کشت درون‌شیشه‌ای *T. gallica* در محیط کشت LS دارای ۳/۳ میکرومولار BA منجر به شاخساره‌زایی و ۰/۵ میکرومولار IBA موجب افزایش شاخه‌دهی جانبی و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها شد (Lucchesini *et al.*, 1993). *T. chinensis* در حضور تنظیم‌کننده NAA با غلظت ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[۷] سبب القای پینه شد. حضور غلظت‌های مختلف BA باززایی را در ریزنمونه‌های ساقه‌ای گیاه القا کرد (Xian-fang, 2009). در مطالعه‌ای دیگر کشت درون‌شیشه‌ای *T. chinensis* در محیط MS دارای یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط القای باززایی در گز به‌دست آمد (Han and Zhou, 2010). کاربرد مجزای هریک از تنظیم‌کننده‌های BA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و کینتین با غلظت سه میلی‌گرم در لیتر باززایی در ریزنمونه‌های ساقه *T. chinensis* گزارش شده است. همچنین در حضور کینتین سرعت باززایی بیشتر و ایجاد گیاهچه‌های جدید باززایی شده در محیط دارای BA بیشتر بود (Cheng and Zhou, 2001).

با اینکه گونه درختچه گز شاهی قابل ازدیاد با قلمه می‌باشد (بذر آن در دسته بذرهای ریکالسیترنت[۸] می‌باشد و قوه نامیه کمی دارد) ولی ازدیاد آن توسط روش‌های ریزازدیادی درون شیشه‌ای می‌تواند مزایای بسیاری مانند افزایش میزان ازدیاد در مدت زمان کوتاه و معرفی سریع کلون‌های جدیدی که علاوه بر ویژگی‌های زینتی همراه با یکسری مقاومت‌ها نیز باشد، را داشته باشد. بر اساس یکسری آزمایش‌های اولیه در طی کشت درون شیشه‌ای درختچه گز شاهی، پدیده قهوه‌ای شدن عامل بازدارنده مهمی در طی مراحل مختلف باززایی آن محسوب می‌گردد و در سایر پژوهش‌ها نیز به رفع این مشکل اشاره‌ای نشده است. بنابراین، این پژوهش به معرفی بهینه‌سازی یک روش گندزدایی مؤثر و اقتصادی در گز شاهی با استفاده از عوامل گندزدای اقتصادی و ایمن با حداقل پدیده نامطلوب قهوه‌ای شدن پرداخته است.

۱ . Linsmaier-Skoog (LS)

۲ . Benzyl adenine (BA)

۳ . Indole acetic acid (IAA)

۴ . Naphthaleneacetic acid (NAA)

۵ . Kinetin (Kin)

۶ . 2,4-Dichlorophenoxtacetic acid (2,4-D)

۷ . Murashige and Skoog (MS)

۸ . Recalcitrant seed

همچنین در ادامه، بهینه‌سازی مسیر پینه‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای این گونه گز از اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های پایه‌های مادری گز شاهی *T. aphylla* در اواسط اسفندماه از باغ گیاه‌شناسی ملی ایران تهیه شدند. برای تهیه ریزنمونه، قلمه‌ها در گلدان‌های نایلونی دارای ماسه بادی در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشگاه اراک ریشه‌دار گردیدند. محیط کشت MS تکمیل شده با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار[۱] (Sigma-Aldrich) در همه آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. pH نهایی تمامی محیط کشت‌ها در دامنه ۵/۸-۵/۷ تنظیم گردید. نگهداری ریزنمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای ثابت و کنترل شده ۲۴±۰/۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی انجام شد.

آزمایش اول- اثر نوع، مدت زمان اعمال ماده گندزدا و نوع ریزنمونه بر میزان آلودگی درون شیشه‌ای گز شاهی

در این آزمایش برای تهیه ریزنمونه از دو نوع ساقه فصل جاری به قطر تقریبی یک تا دو میلی‌متر و ساقه یکساله به قطر تقریبی دو تا سه میلی‌متر به طول چهار تا پنج سانتی‌متر استفاده شد. در این مرحله به‌منظور اجرای تیمارهای مورد نظر هر دو نوع ریزنمونه ساقه‌ای تحت تیمارهای متفاوت گندزدایی قرار گرفتند. گندزدایی ریزنمونه‌ها ابتدا در اتانول ۷۰ درصد، در سه زمان متفاوت صفر، ۳۰ و ۶۰ ثانیه انجام شد. پس از این مرحله غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در محلول ۲۰ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری (سفیدکننده خانگی تاژ با پنج درصد کلر) به‌همراه یک قطره مایع ظرفشویی (به‌عنوان برقرارکننده سطح تماس بیشتر گندزدا با ریزنمونه) در مدت زمان صفر، ۱۰ و ۲۰ دقیقه اعمال شد. برای حذف بقایای مواد گندزدا، پس از گندزدایی ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل سه بار آبشویی شدند. ریزنمونه‌های گندزدایی شده به قطعات یک تا دو سانتی‌متری برش داده شد و به محیط کشت منتقل شدند. ارزیابی آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ترشح فنل از روز سوم تا روز چهاردهم پس از کشت بر اساس درصد در هر تکرار انجام شد. در پایان، یک ماه پس از کشت اگر آلودگی‌های تأخیری به‌ویژه آلودگی باکتریایی مشاهده می‌شد، در ارزیابی نهایی منظور می‌گردید.

آزمایش دوم- اثر محلول‌پاشی ائوجینول[۲] و قارچ‌کش در کنترل آلودگی‌ها

در آزمایش مرحله قبل کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی به‌طور کامل و صددرصد در تیمارهای مورد نظر انجام نشد و افزایش غلظت مواد گندزدا نیز منجر به اثر منفی در ریزنمونه‌ها گردید. بنابراین برای اجتناب از اثرهای نامطلوب مواد شیمیایی گندزدا، ترکیبی از قارچ‌کش سیستمیک متیل‌تیوفانات با نام تجاری توپسین ام[۳] (شرکت خزر سم کود) همراه با ماده ائوجینول (شرکت سیگما) به‌عنوان یکی از ترکیبات اصلی عصاره گیاه میخک برای محلول‌پاشی پایه مادری در نظر گرفته شد. به‌منظور اجرای پیش‌تیمار گندزدایی یک روز قبل از تهیه ریزنمونه‌ها، محلول‌پاشی پایه مادری با قارچ‌کش متیل‌تیوفانات (۰/۲ درصد) و ترکیب ائوجینول (۰/۵ درصد) (Taghizadeh *et al.*, 2016) اجرا شد. گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های حاصل از شاخه‌های فصل جاری (بر اساس آزمایش قبل، چون شاخه‌های یکساله آلودگی و ترشح فنل بیشتری داشتند، در این آزمایش و آزمایش‌های بعد این نوع ریزنمونه حذف گردید) در زیر آب جاری و مایع ظرفشویی به‌مدت یک ساعت و بعد گندزدایی با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه و بعد غوطه‌وری در محلول هیپوکلریت سدیم تجاری ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. ارزیابی ریزنمونه‌ها پس از گذشت سه تا هفت روز از کشت، با ثبت میزان آلودگی قارچی و باکتریایی و نکروز شدن ریزنمونه انجام شد. ۱۴ روز

۱ . Agar-agar

۲ . Eugenol

۳ . Topsin M (%70 WP)

پس از کشت تجمع فنل و سیاه شدن ریزنمونه بر اساس درصد ثبت شد.

آزمایش سوم- اثر ائوجینول در محیط کشت برای کنترل آلودگی‌ها، ترشح فنل و زنده‌مانی ریزنمونه‌های شاخه فصل جاری

در این آزمایش اثر استفاده از عصاره ائوجینول در داخل محیط کشت با سه غلظت متفاوت صفر، ۰/۰۱ و ۰/۱ درصد به‌صورت ایجاد چاهک با سرنگ در داخل پتری‌های محیط کشت روی ضدعفونی ریزنمونه‌های حاصل از شاخه‌های فصل جاری بررسی شد. به‌منظور گندزدایی ریزنمونه‌ها از بهترین تیمار آزمایش اول استفاده شد. سپس ریزنمونه‌ها در محیط دارای غلظت‌های متفاوت ائوجینول کشت شدند. ارزیابی صفات مورد نظر شامل آلودگی‌های باکتریایی و قارچی، ترشح فنل و نکروز شدن بافت ریزنمونه ۱۴ روز پس از کشت انجام شد.

آزمایش چهارم- اثر اکسین‌های مختلف بر میزان پینه‌زایی ریزنمونه‌های فصل جاری گز شاهی

در این آزمایش اثر دو تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D و NAA به‌صورت جداگانه هریک با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بر صفات پینه‌زایی و میزان ترشح فنل در ریزنمونه‌های فصل جاری گز شاهی بررسی شد. کشت ریزنمونه در محیط کشت MS بدون هورمون نیز به‌عنوان محیط شاهد در کنار سایر تیمارها انجام گردید. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم تجاری ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه در محیط کشت القای پینه دارای اکسین‌های مختلف قرار گرفتند. کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۰/۵±۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی به‌مدت یک ماه قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته، ارزیابی روزانه به‌منظور بررسی زمان انگیزش ریزنمونه‌ها انجام شد. ارزیابی نهایی کشت‌ها در صفات درصد القای پینه، حجم پینه، ترشح فنل، بافت و رنگ پینه‌های تشکیل شده پس از گذشت سی روز انجام شد. حجم پینه با درجه‌بندی از کد صفر (عدم پینه‌زایی) تا کد پنج (بیشترین پینه‌زایی) ارزیابی گردید (جدول ۱). درصد القای پینه بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Khan *et al.*, 2015). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید.

$$\text{درصد القای پینه} = \frac{\text{تعداد ریزنمونه تشکیل‌دهنده پینه}}{\text{تعداد ریزنمونه کشت‌شده}} \times ۱۰۰$$

آزمایش پنجم- اثر نوع ریزنمونه کشت شده در اندام‌زایی گز شاهی

در این آزمایش انگیزش شاخساره در دو نوع ریزنمونه که از شاخه‌های فصل جاری و یکساله گرفته شده و با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم تجاری ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه گندزدایی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت هر دو نوع ریزنمونه شامل دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (Lucchesini *et al.*, 1993). از هفته اول کشت، هر نوع علائم مانند پینه‌زایی، شاخساره‌زایی و یا ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های تحت کشت ارزیابی و مورد ثبت قرار گرفت.

طرح آزمایشی و تجزیه داده‌ها

به‌جز آزمایش اول که در قالب آزمایش فاکتوریل (اثر نوع ریزنمونه و مدت زمان اعمال تیمار) بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد، سایر آزمایش‌ها در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا گردید. آزمایش‌ها با چهار تکرار و ۵ مشاهده در هر تکرار انجام شد. تجزیه داده‌های حاصل از تمامی آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه۹,۱) و با روش آماری ANOVA بررسی گردید. آزمون چنددامنه‌ای دانکن[۱] به‌منظور مقایسه میانگین و تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. داده‌های غیرنرمال با استفاده از روش لگاریتمی نرمال شدند.

جدول ۱- درجه‌بندی کیفی ریزنمونه‌ها برای ارزیابی حجم کالوس

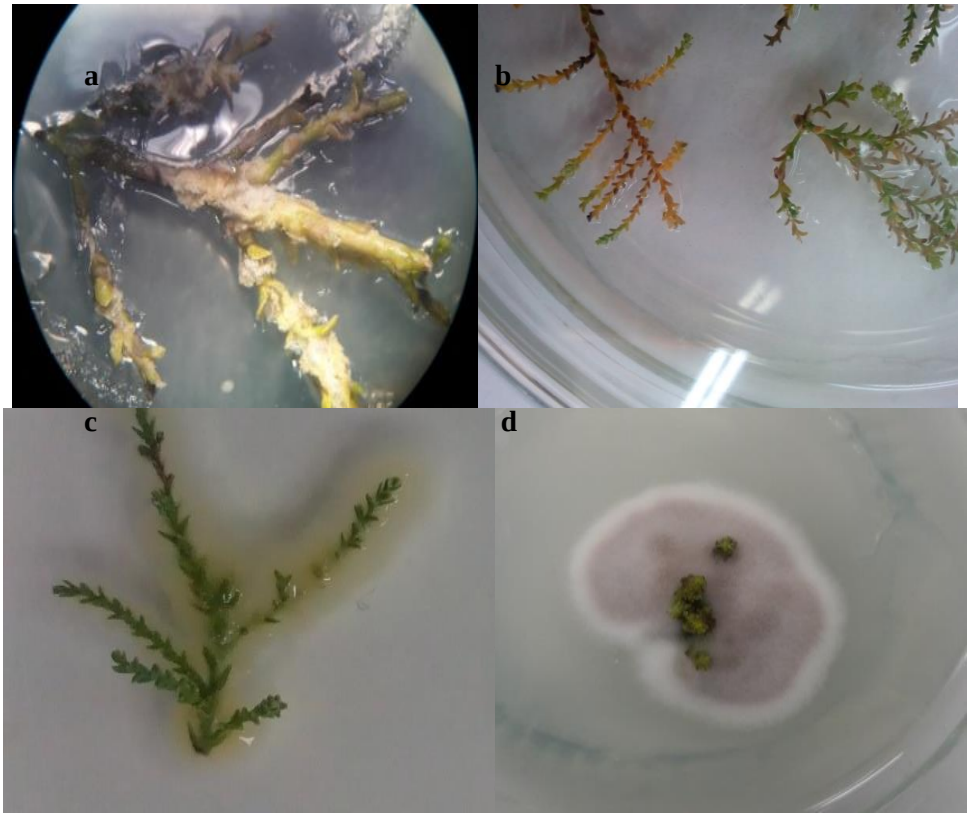
۱ . Duncan's Multiple Range Test

درجه‌بندی	حجم کالوس
صفر	عدم تشکیل کالوس
۱	حجم کم (طول کمتر از ۰/۵ سانتی‌متر)
۳	حجم متوسط (طول بین ۱- ۰/۵ سانتی‌متر)
۵	حجم زیاد (طول بیش از ۱ سانتی‌متر)

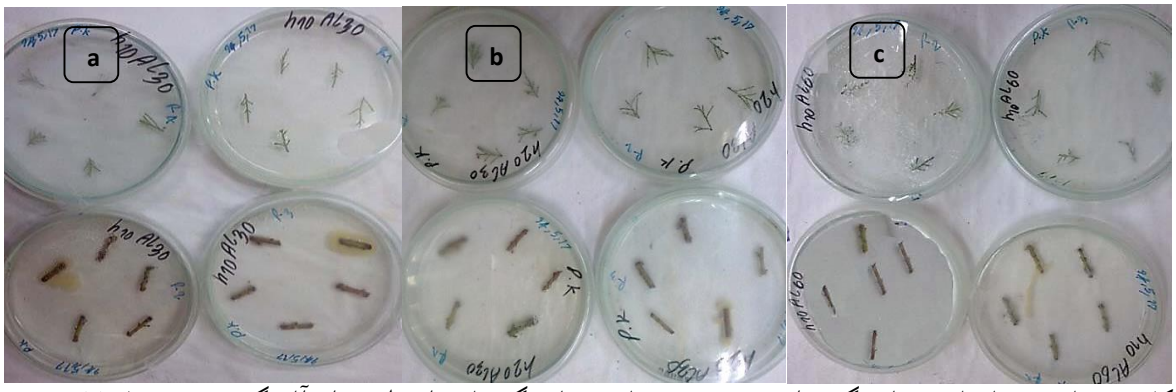
نتایج

آزمایش اول- اثر نوع ریزنمونه و مدت زمان اعمال ماده گندزدا بر میزان آلودگی درون شیشه‌ای گز شاهی

در این آزمایش، ترشح و تجمع فنل در بافت ریزنمونه با گذشت ۱۴ روز از کشت انجام شد (شکل۱). در تیمارهای مختلف آلودگی قارچی مشاهده نشد و آلودگی ریزنمونه‌ها فقط از نوع باکتریایی بود. با افزایش زمان گندزدایی اتانول و هیپوکلریت سدیم، میزان آلودگی باکتریایی در هر دو نوع ریزنمونه کاهش یافت، به‌طوری‌که کمترین میزان آلودگی باکتریایی در هر دو نوع ریزنمونه در زمان ۶۰ ثانیه اتانول و هر دو زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم به‌دست آمد. در ریزنمونه‌های یکساله کنترل تقریبا ۷۰ درصدی آلودگی باکتریایی با کاربرد اتانول به تنهایی به‌مدت ۶۰ ثانیه و یا هیپوکلریت سدیم به تنهایی در زمان ۲۰ دقیقه نسبت به شاهد به‌دست آمد. البته کاربرد یکی از گندزداها به تنهایی قادر به کنترل آلودگی باکتریایی در ریزنمونه‌های گز شاهی نبود. میزان مطلوب کنترل آلودگی باکتریایی در ترکیب حداکثر زمان استفاده از اتانول به همراه تیمار با هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه بود. کاربرد زمان گندزدایی ۶۰ ثانیه اتانول و ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم در ریزنمونه‌های فصل جاری کمترین میزان ترشح فنل را در تیمارها نشان داد. افزایش زمان گندزدایی هیپوکلریت سدیم از ۱۰ به ۲۰ دقیقه به همراه افزایش زمان گندزدایی با اتانول منجر به افزایش قابل توجه ترشح فنل به‌ویژه در ریزنمونه‌های یکساله شد (جدول ۲).



شکل ۱- ترشح فنل از بافت ریزنمونه (a)، نکروز شدن ریزنمونه (b)، آلودگی باکتریایی (c) و آلودگی قارچی (d) در کشت درون شیشه‌ای گز شاهی



شکل ۲- مقایسه تیمارهای مختلف گندزدایی در ریزنمونه‌های مختلف گز شاهی از نظر میزان آلودگی و ترشح فنل (a) ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم و ۳۰ ثانیه اتانول، (b) ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم و ۳۰ ثانیه اتانول، (c) ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم و ۶۰ ثانیه اتانول (ردیف بالا در هر تیمار، ریزنمونه‌های حاصل از شاخه فصل جاری و ردیف پایین ریزنمونه‌های حاصل از شاخه یکساله می‌باشد).

جدول ۲- اثر متقابل نوع ریزنمونه و مدت زمان اعمال اتانول و هیپوکلریت سدیم بر آلودگی باکتریایی و ترشح فنل در کشت درون‌شیشه‌ای گز شاهی

نوع ریزنمونه	زمان اعمال اتانول (ثانیه)	زمان اعمال هیپوکلریت سدیم (دقیقه)	آلودگی باکتریایی (درصد)	ترشح فنل (درصد)
ساقه فصل جاری	شاهد (بدون اعمال تیمار)	شاهد	۹۵/۴±۰ f	۶۸/۷±۰ gh
		۱۰	۸۶/۳±۱۸/۴ f	۲۷/۵±۱۰ cde
		۲۰	۶۶/۶±۱۳/۲ e	۳۱/۲±۵ bcd
	۳۰	شاهد	۶۰±۸/۷ e	۲۵±۲/۹ abc
		۱۰	۵۵/۷±۲۳ de	۱۲/۵ ±۹ ab
		۲۰	۳۲±۸/۶ bc	۲۷/۵±۴/۳ cde
	۶۰	شاهد	۳۶±۰ cd	۳۱/۲±۵/۵ bcd
		۱۰	۱۳/۳±۷/۲ ab	۶/۲±۰ a
		۲۰	۱۳/۳±۶/۵ ab	۵۰±۰ ef
ساقه یکساله	شاهد (بدون اعمال تیمار)	شاهد	۸۶/۳±۰ f	۶۲/۵±۰ fgh
		۱۰	۳۶±۱۱/۱ cd	۱۲/۵ ±۶ ab
		۲۰	۲۸±۱۰/۵ abc	۵۶/۲±۶/۳ fg
	۳۰	شاهد	۳۶±۴/۳ cd	۳۳/۷±۱۲ de
		۱۰	۲۰±۰ abc	۲۵±۸/۲ abc
		۲۰	۲۰±۱۴ abc	۶۸/۷±۰ gh
	۶۰	شاهد	۲۰±۰ abc	۵۶/۲±۰ fg
		۱۰	۱۰±۰ a	۵۰±۲/۴ ef
		۲۰	۱۰±۶/۵ a	۷۵±۶/۵ h

حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

آزمایش دوم- اثر محلول‌پاشی پایه مادری با ائوجینول و قارچ‌کش تیوفانات متیل برای کنترل آلودگی‌ها

در آزمایش مرحله قبل استفاده از مواد شیمیایی گندزدا اگرچه توانست از لحاظ آماری کنترل معنی‌داری در آلودگی در کشت درون‌شیشه‌ای ایجاد نماید، اما موجب کنترل کامل آن نشد. استفاده از زمان‌های بیشتر گندزدایی نیز منجر به آسیب شدید بافت‌ها در اثر تخریب غشا، آزاد شدن محتویات سلول و به‌دنبال آن افزایش آلودگی باکتریایی و ترشح فنل گردید که نتایج آن به دلیل مرگ بیشتر ریزنمونه‌ها مورد تجزیه آماری قرار نگرفت. در این آزمایش استفاده از ائوجینول برای محلول‌پاشی پایه مادری در کنترل آلودگی قارچی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد، در صورتی‌که قارچ‌کش تیوفانات متیل کمترین میزان آلودگی قارچی را در بین تیمارها نشان داد و این میزان را به کمتر از نصف نسبت به شاهد کاهش داد (جدول ۳). البته اثر محلول‌پاشی پایه مادری با این دو نوع ترکیب بر میزان آلودگی باکتریایی و ترشح فنل معنی‌دار نبود.

جدول ۳- اثر تیمارهای محلول‌پاشی پایه مادری با قارچ‌کش تیوفانات متیل و ائوجینول بر کنترل آلودگی قارچی ریزنمونه گز شاهی

نام تیمار	آلودگی قارچی (درصد)	آلودگی باکتریایی (درصد)	ترشح فنل (درصد)

شاهد	۳۶±۱۰ b	۵۶/ ۲± ۹/۴ a	۳۳/۷ ± ۵/۹ a
ائوجینول	۲۸±۵/۵ ab	۶۲/۵ ± ۱۰/۱ a	۳۱/۲±۶ /۳ a
تیوفانات متیل	۱۳/۳±۷/۸ a	۲۵ ± ۱۰/۵ a	۲۷/۵ ±۸ a

حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

آزمایش سوم- اثر ائوجینول در محیط کشت برای کنترل آلودگی‌ها، ترشح فنل و زنده‌مانی ریزنمونه‌های شاخه فصل جاری

به‌منظور گندزدایی ریزنمونه‌ها، در این مرحله از تیمار بهینه آزمایش اول شامل گندزدایی با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. غلظت‌های صفر تا ۰/۱ درصد ائوجینول در محیط کشت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در حضور این ماده بر میزان آلودگی باکتریایی، قارچی و ترشح فنل نسبت به شاهد بود. آلودگی باکتریایی تنها در ائوجینول ۰/۱ درصد کنترل شد و به نزدیک یک‌سوم میزان آلودگی در شاهد کاهش یافت. همچنین کاربرد ائوجینول ۰/۱ درصد در محیط کشت میزان آلودگی قارچی را نسبت به شاهد تقریباً به یک چهارم کاهش داد. افزایش غلظت ائوجینول میزان ترشح فنل در بافت‌های گیاهی را نسبت به شاهد به‌میزان تقریبا یک دوم کاهش داد. میزان نکروز بافت ریزنمونه‌ها در غلظت ۰/۱ درصد بیش از شش برابر شاهد بود ولی در غلظت ۰/۰۱ درصد تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت (جدول ۴).

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف ائوجینول در محیط کشت بر کنترل آلودگی‌ها، ترشح فنل و نکروز بافت ریزنمونه

غلظت ائوجینول	آلودگی باکتریایی (درصد)	آلودگی قارچی (درصد)	ترشح فنل (درصد)	نکروز بافت (درصد)
صفر (شاهد)	۴۰±۸/۲ b	۲۸±۳ /۵ b	۳۱/۵ ±۰ b	۱۵/۶±۰ a
۰/۰۱ درصد	۲۰±۱۰ ab	۱۳/۳±۳/۵ a	۱۷/۵ ±۰/۲ a	۲۷/۵±۰ a
۰/۱ درصد	۱۰±۹/۱ a	۶/۶ ±۳ a	۱۶/۲۵ ±۰/۳ a	۹۸±۰/۱ b

حروف مشابه تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

آزمایش چهارم- اثر اکسین‌های مختلف بر میزان پینه‌زایی ریزنمونه‌های فصل جاری گز شاهی

القای پینه در محیط کشت دارای 2,4-D از کل قسمت‌های ریزنمونه به‌صورت همزمان آغاز شد و پینه حاصل بافت ترد و شکننده، به رنگ‌های زرد مایل به قهوه‌ای روشن تا تیره و قرمز را داشت (شکل ۳-ب). پینه‌های شکل‌گرفته در حضور اکسین NAA از نوع فشرده و به‌رنگ سفید تا شیری بودند و انگیزش پینه در نقاطی از سطح ریزنمونه و محل برش آغاز شد. همچنین پینه‌های انگیزش یافته در محیط کشت دارای NAA رشد کمتری نیز نسبت به پینه‌های محیط کشت دارای 2,4-D داشتند. تنظیم‌کننده رشد 2,4-D القا و حجم پینه مناسبی را نسبت به شاهد (عدم کاربرد تنظیم‌کننده رشد) ایجاد کرد. در محیط کشت دارای اکسین NAA اگرچه به میزان ۹۲ درصد پینه‌زایی مشاهده شد ولی حجم پینه ایجاد شده در آنها نسبت به محیط کشت 2,4-D و شاهد بسیار کم بود. حجم پینه القا شده در محیط کشت دارای 2,4-D از همه بیشتر و در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد از همه کمتر به‌دست آمد. هورمون 2,4-D در کاهش زمان انگیزش پینه نیز اثر مثبت داشت و کمترین زمان انگیزش پینه (۹/۴۰ روز از زمان کشت ریزنمونه) را به‌خود اختصاص داد. همچنین تیمار هورمونی 2,4-D موجب افزایش ترشح فنل شد، این میزان ترشح فنل در محیط دارای NAA کمتر (۳/۵ درصد) و در شاهد (۲/۲۵

درصد) به میزان حداقل رسید (جدول ۵).

جدول ۵- اثر محیط کشت دارای تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر پینه‌زایی و ترشح فنل در ریزنمونه‌های فصل جاری

تیمار	القای پینه (درصد)	حجم پینه (درجه‌بندی)	زمان انگیزش پینه (روز)	ترشح فنل (درصد)	بافت پینه
بدون تنظیم‌کننده رشد	۴۸±۰ b	۰/۵۴±۰/۱ c	۱۱/۶۰±۲/۲ b	۲/۲۵±۰ a	سفید نشاسته‌ای
(۱ mg/lit) 2,4-D	۹۶±۵/۵ a	۳/۶۸±۰/۵ a	۹/۴۰±۲/۳ a	۵/۷۵±۱/۱ b	ترد کرم تا خاکستری و قهوه‌ای
(۱ mg/lit) NAA	۹۲±۵ a	۳±۰/۵۱ b	۱۱/۴۰±۲ b	۳/۵±۰/۸۱ a	فشرده سفید تا شیری

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

آزمایش پنجم: اثر نوع ریزنمونه کشت شده در اندام‌زایی گز شاهی

در این آزمایش علاوه بر شاخساره‌زایی، انگیزش پینه و همچنین ریشه‌زایی نیز در ریزنمونه‌های کشت شده مشاهده شد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر نوع ریزنمونه بر شاخساره‌زایی معنی‌دار نبود ولی بر صفات ریشه‌زایی و پینه-زایی معنی‌دار بود (جدول ۶). به‌عبارتی دیگر دو نوع شاخه یکساله و سال جاری توان یکسانی در انگیزش شاخساره نابجا داشتند و به‌عبارت دیگر از نظر آماری تفاوت معنی‌دار آماری بین این دو نوع ریزنمونه مشاهده نشد ولی در صفات انگیزش پینه و ریشه پاسخ متفاوتی داشتند (شکل ۳-ج). در شاخه سال جاری پینه‌زایی رخ نداد، فقط شاخساره‌زایی و به‌مقدار جزئی انگیزش ریشه مویین از ریزنمونه‌ها رخ داد. در شاخه یکساله علاوه بر شاخساره‌زایی، پینه‌زایی و ریشه-زایی نیز انجام شد (جدول ۷ و شکل ۳).

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه در مرحله باززایی گز شاهی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		شاخساره‌زایی	کالوس‌زایی	ریشه‌زایی
تیمار	۱	۰/۸۲^{ns}	۰/۵۱*	۵/۹۴**
خطا	۵	۰/۵۱	۰/۰۳	۰/۱۲
ضریب تغییرات (CV)٪		۱۷	۱۷/۹	۱۹/۵

^{ns}: اثر معنی‌دار نشده است، *،** : اثر معنی‌دار به‌ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۷– اثر نوع ریزنمونه بر پینه‌زایی و ریشه‌زایی گز شاهی

اندام گیاه	شاخساره‌زایی (درصد)	حجم پینه‌زایی (درجه‌بندی)	ریشه‌زایی (درصد)
شاخه یکساله	۲۰/۴±۸ ^{a}	۱/۱۱±۰/۵۹ ^{a}	۶/۲۵±۲/۵ ^{a}
شاخه سال جاری	۱۴/۲±۳ ^{a}	۰±۰ ^{b}	۰±۰ ^{b}

در هر ستون حروف مشابه تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن نشان ندادند.

شکل ۳- مراحل مختلف پینه‌زایی و اندام‌زایی در گز شاهی: الف) سیاه‌شدن ریزنمونه‌ها در محیط کشت، ب) پینه‌زایی در محیط کشت، 2,4-D، د) اندام‌زایی در محیط کشت دارای BAو IBA ج) ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت

بحث

بر اساس آزمایش اول بهترین تیمار گندزدایی برای کنترل آلودگی‌های باکتریایی (کمتر از ۱۴ درصد) و ترشح فنل (کمتر از ۷ درصد) در ریزنمونه‌های فصل جاری استفاده از تیمار ترکیبی ۶۰ ثانیه اتانول به‌همراه ۱۰ دقیقه گندزدایی هیپوکلریت سدیم و در ریزنمونه‌های یکساله تیمار ترکیبی ۳۰ ثانیه اتانول به‌همراه ۱۰ دقیقه گندزدایی هیپوکلریت سدیم بود. همسو با این نتایج، بررسی روش گندزدایی اعمال شده بر گز *T.gallica* با استفاده از ریزنمونه‌های شاخه یکساله و تیمار ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم توانست پاسخ مناسبی را برای گندزدایی در کشت درون‌شیشه‌ای نشان دهد (Lucchesini *et al.*, 1993). در کشت درون‌شیشه‌ای *T.tetrandra* استفاده از روش گندزدایی با اتانول به‌مدت ۱۰ ثانیه به‌همراه هیپوکلریت سدیم و Tween 80 به‌مدت ۱۵ دقیقه بر ساقه‌های فصل جاری بهترین نتیجه را داشت (Orabi *et al.*, 2011).البته استفاده از روش‌های گندزدایی دو مرحله‌ای برای برخی گونه‌های گیاهی مفید ارزیابی شده است. اتانول معمولاً در ترکیب با هیپوکلریت سدیم اثرگذاری بیشتری دارد (Oyebanji *et al.*, 2009). افزایش زمان اعمال هیپوکلریت سدیم در گندزدایی ریزنمونه‌های فصل

جاری گز شاهی از ۱۰ به ۲۰ دقیقه میزان آلودگی باکتریایی را به‌ویژه در ریزنمونه فصل جاری کاهش داد. به گونه‌ای مشابه کاربرد هیپوکلریت سدیم به تنهایی با افزایش غلظت و زمان اعمال بر جوانه جانبی آناناس منجر به کنترل بهتر آلودگی گردید (Acheampong *et al.*, 2015). همچنین در ریزازدیادی گیاهان چوبی مانند زرشک (Sazmand and Safarnezhad, 2016) و اکالیپتوس (Abravesh *et al.*, 2019) کاربرد هیپوکلریت سدیم در زمان‌های ۱۵ تا ۱۸ سبب کنترل مناسب آلودگی‌های درون‌شیشه‌ای گردید. یکی از مشکلات موجود در گندزدایی ریزنمونه‌های شاخه فصل جاری در گز شاهی فلس‌دار بودن این نمونه‌ها بود که سبب افزایش زیاد میزان آلودگی باکتریایی در محیط کشت نسبت به ساقه یکساله شد. استفاده از تیمار ترکیبی هیپوکلریت سدیم و اتانول با مدت زمان بهینه به همراه روش‌های مکمل مانند محلول‌پاشی پایه‌های مادری با ترکیباتی مانند قارچ-کش تیوفانات متیل و ائوجنول و کاربرد ائوجنول در محیط کشت توانست بر این مشکل غلبه نماید. افزایش زمان گندزدایی با هیپوکلریت سدیم از ۱۰ به ۲۰ دقیقه میزان ترشح فنل از بافت ریزنمونه را به میزان زیادی افزایش داد و سبب از بین رفتن آنها شد. ماده گندزدای هیپوکلریت سدیم با اکسید کردن مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ساختار میکروب‌ها را تخریب و آنها را از بین می‌برد (Yildiz and Er, 2002). همچنین می‌تواند با ایجاد ترکیبات سمی مانند کلروفرم و کلروفنل اثرهای نامطلوب بر ریزنمونه گیاهی داشته باشد (Duan *et al.*, 2016).

بررسی اثر غلظت‌های زیاد هیپوکلریت سدیم بر ریزنمونه‌های انتهایی شاخساره در گیاه علفی *Arnebia densiflora* Ledeb. نشان داد که اگرچه افزایش غلظت گندزدا کاهش میزان آلودگی را باعث شد ولی مرگ بیشتر ریزنمونه‌ها را به‌دنبال داشت (Çölgeçen *et al.*, 2011). در این بررسی استفاده از زمان اتانول ۶۰ ثانیه همراه با هیپوکلریت سدیم ۲۰ دقیقه در ریزنمونه‌های شاخه یکساله بیشترین میزان ترشح فنل را ایجاد کرد. میزان فنل تحت تأثیر بسیاری از عوامل داخلی و خارجی مانند نور، مواد غذایی به‌ویژه منابع کربوهیدرات، برخی تنش‌ها مانند خشکی، آب، تشعشع و آلودگی پاتوژن‌ها قرار می‌گیرد (Ozyigit, 2008). در این آزمایش در شاهد (عدم گندزدایی) میزان ترشح فنل ریزنمونه‌های گز شاهی تا حد زیادی وابسته به آلودگی باکتریایی بود و ریزنمونه‌های آلوده شده با باکتری، ترشح زیاد فنل، سیاه شدن و مرگ سریع ریزنمونه را نشان دادند. البته میزان ترشح فنل در این آزمایش به نوع ریزنمونه تهیه شده از گیاه مادری نیز بستگی داشت، به‌طوری‌که ریزنمونه‌های ساقه یکساله ترشح فنل شدیدتری (به‌طور متوسط ۴۸ درصد) را نسبت به ساقه فصل جاری (به‌طور متوسط ۳۰ درصد) نشان داد (جدول ۲). مشابه با نتایج این آزمایش قهوه‌ای شدن بافت پینه حاصل از کشت ریزنمونه‌های کاج[۱] در اثر ترشح فنل گزارش گردید که در ریزنمونه‌های جوانه‌های حاصل از درختان بالغ، قهوه‌ای شدن بافت به میزان معنی‌داری زیادتر بود (Laukkanen *et al.*, 1999).

در آزمایش دوم محلول‌پاشی پایه‌های مادری با استفاده از ائوجینول در کنترل آلودگی‌های ایجاد شده در ریزنمونه‌ها اثر معنی‌داری نداشت که احتمالا غلظت کم این ماده برای نفوذ به بافت، دلیلی بر اثرگذاری کم ائوجینول بر کنترل آلودگی قارچی در این آزمایش می‌باشد. استفاده از قارچ‌کش تیوفانات متیل به صورت محلول‌پاشی پایه مادری کاهش ۲۳ درصدی آلودگی قارچی را در ریزنمونه‌های گز شاهی نشان داد. قارچ‌کش‌های زیادی برای استفاده در کشت بافت گیاهی در دسترس می‌باشند که در برابر پاتوژن‌های قارچی گیاهی مؤثر هستند (Shields *et al.*, 1984). مشابه نتایج این تحقیق در کشت بافت پیاز لاله زینتی استفاده از پیش‌تیمار بنومیل برای گندزدایی ریزنمونه‌ها به‌مدت شش ساعت کنترل ۶۴ درصدی آلودگی را بدون ایجاد اثرهای منفی بر ریزنمونه‌ها در محیط کشت ایجاد کرد (Taghizadeh *et al.*, 2006).استفاده از تیوفانات متیل با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر در کشت درون شیشه‌ای قارچ

---

۱. *Pinus sylvestris* L.

Rosellinia nectarix کنترل صددرصدی قارچ را نشان داد (López-Herrera and Zea-Bonilla, 2007).

در آزمایش سوم غلظت ۰/۰۱ درصد ائوجینول به‌عنوان تیمار مطلوب معرفی گردید. مشابه با این نتایج Shahavi و همکاران (2015) روند کاهشی آلودگی باکتریایی *E. coli* و *B. cereus* را با استفاده امولسیون نانوائوجینول به‌دست آوردند، به‌نحوی‌که کنترل کامل آلودگی در غلظت ۳۲ میکروگرم در لیتر در محیط کشت دیده شد. ترکیب ائوجینول می‌تواند ساختار پروتئین‌ها را شکسته و با فسفولیپیدها در غشاهای سلولی واکنش دهد. همچنین می‌تواند نفوذپذیری غشای سلول را تغییر داده و تعداد زیادی از باکتری‌های گرم مثبت، منفی و همین‌طور مخمرها را مهار نماید (Shahavi *et al*., 2015) و به‌این ترتیب بر رشد پاتوژن‌های گیاهی مؤثر باشد. در آزمایش سوم افزایش غلظت ائوجینول در محیط کشت باعث کاهش میزان ترشح فنل (۱۵-۱۴ درصد) نسبت به شاهد گردید. ائوجینول نیز به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان معرفی شده است که با مهار رادیکال‌های آزاد همراه است و با حفاظت سلول‌ها از آسیب اکسیدان‌ها منجر به افزایش عمر مفید در سلول‌ها می‌شود (Adorjan and Buchbauer, 2010). افزایش قابل توجه نکروز شدن بافت گیاهی با حضور ائوجینول در محیط با غلظت ۰/۱ درصد در این آزمایش مشاهده شد، به‌گونه‌ای که این غلظت ائوجینول مرگ ۹۸ درصدی ریزنمونه‌ها را به‌دنبال داشت (جدول ۴). عصاره‌های گیاهی با اثرگذاری بر غشای سلول و اندامک‌ها نفوذپذیری غشا را دچار اختلال کرده و نشت یونی را در آنها سبب می‌شوند (Bakkali et al., 2008)، به این ترتیب با نشت محتوای پروتئینی و لیپیدی، زوال و مرگ سلول را القا می‌کنند (Oyedemi *et al*., 2009). بر اساس تحقیقات انجام شده، گزارش شده است که ساختار شیمیایی ائوجینول ویژگی ضد قارچی آنها را تعیین می‌کند و ترکیبات فنولیک ائوجینول از سمیت بالایی در برابر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی برخوردار است (Manganyi Morcia *et al*., 2012; et al., 2015). با توجه به مطالعات در مورد سازوکار فعالیت ضد میکروبی، Campaniello و همکاران (۲۰۱۰) پیشنهاد کردند که فعالیت ضد قارچی را می‌توان تا حدودی به وجود یک گروه فنولیک و در نتیجه آسیب به غشای سلولهای قارچی نسبت داد. بر اساس این فرض اختلال در غشا سبب آزاد شدن اجزای داخل سلولی قارچی می‌شود. علاوه‌براین Gill و Holley (۲۰۰۶) گزارش کردند که اختلال در غشا توسط ائوجینول در اثر مهار فعالیت آنزیم‌های زیر است: ATPase، هیستیدین دکربوکسیلاز، آمیلاز و پروتئاز. مهار ATPase در غلظت‌های زیاد اوژنول سبب مرگ سلول می‌شود، زیرا تولید انرژی لازم برای تکثیر سلول مختل می‌شود. یکی از دلایل اثربخشی روغن ائوجینول، ویژگی چربی‌دوستی[۱] آنها است، بنابراین به راحتی در بافت‌های گیاهی جذب می‌شود و بیشترین نتیجه را در وابستگی به افزایش غلظت اسانس دارد (Mokbel et al., 2017).

بر اساس نتایج آزمایش چهارم، القا پینه در ریزنمونه-های شاخه‌ای گز شاهی در محیط کشت دارای اکسین و فاقد اکسین انجام شد. این موضوع نشان می‌دهد که احتمالاً سطح اکسین درون‌زا در گیاه گز شاهی تا حدی بالا است که توانسته در غیاب اکسین خارجی و یا حتی اکسین ضعیفی مانند NAA پینه‌زایی داشته باشد. در حضور 2,4-D حجم پینه‌زایی نسبت به سایر محیط کشت-ها بیشتر بود، همچنین زمان انگیزش پینه کاهش یافت. بر پایه مطالعات موجود در گونه‌های مختلف گز به‌منظور القای پینه‌زایی و شاخساره‌زایی ترکیبات متنوعی از اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها معرفی شده‌اند. القای پینه در *T.tetrandra* در نسبت کمتر BA نسبت به اکسین‌های 2,4-D و NAA گزارش شده است (Orabi *et al*., 2011; Xian-fang, 2009). در تحقیقات متعددی 2,4-D به‌عنوان یک اکسین مؤثر در القا و تشکیل پینه در بسیاری از گونه‌های گیاهی معرفی شده است (Taghizadeh *et al*., 2006; Orabi *et al*., 2011;

۱. Lipophilic

Osman et al., 2016). مشابه نتایج این آزمایش، تکثیر شدید پینه در حضور 2,4-D نسبت به NAA در پکان[۱] مشاهده شده است. این موضوع را می‌توان به تحرک و فعالیت بیشتر 2,4-D و ترکیب‌پذیری کمتر با بافت زنده نسبت داد (Rodriguez and Wetzstein, 1998). در این بررسی بیشترین سطح ترشح فنل در تیمار 2,4-D دیده شد. تولید کوئینون، تجمع و اکسید شدن پلی‌فنل‌ها منجر به سیاه‌شدن بافت و محیط کشت می‌گردد که برای بافت‌های گیاهی سمی می‌باشد (Naz and Khatoon, 2014). قهوه‌ای شدن بافت در اثر ترشح فنل یک مانع جدی در استقرار کشت درون‌شیشه‌ای گیاهی به‌ویژه گیاهان چوبی است (Gatica Arias *et al.*, 2010). اثر نوع و غلظت اکسین مورد استفاده در زنده‌مانی و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه قره‌قاط به اثبات رسیده است که با نتایج این آزمایش مبنی بر اثر نوع اکسین بر ترشح فنل و کالوس‌زایی مشابهت دارد (Noruzpour *et al.*, 2019). همسو با نتایج ما هورمون 2,4-D در محیط کشت *Achyranthes aspera* در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر قهوه‌ای شدن پینه‌ها را موجب شد (Naz and Khatoon, 2014). پینه‌های به‌دست آمده در گیاه دارویی *Byrosonima verbascifolia* L. در حضور غلظت‌های مختلف 2,4-D فنل زیادی را به محیط کشت ترشح کردند (Castro *et al.*, 2016). نوع و غلظت اکسین یا سایتوکینین و همین‌طور نسبت اکسین/ سایتوکینین می‌تواند الگوی سنتز و غلظت متابولیت‌های ثانویه را در کشت سلول و بافت گیاهی تغییر دهد (Palacio *et al.*, 2012). 2,4-D از دسته اکسین‌های فنوکسی است که محرک قوی برای ایجاد و رشد پینه نسبت به NAA می‌باشد. این هورمون به‌دلیل داشتن اکسیژن در حلقه فنلی خود در محیط کشت کمتر تحت تأثیر آنزیم‌های پراکسیداز ترشح‌شده از بافت‌های ریزنمونه قرار می‌گیرد و نسبت به سایر اکسین‌ها پایدارتر و فعال‌تر می‌باشد (Taghizadeh *et al.*, 2006). بنابراین احتمالا امکان وارد کردن تنش بیشتر به ریزنمونه‌های گز شاهی نسبت به تنظیم‌کننده رشد NAA را در آزمایش چهارم دارد. به‌منظور باززایی مستقیم درختچه گز، با استفاده از ترکیب دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA القای شاخساره از ریزنمونه‌های شاخه سال جاری و شاخه یکساله انجام شد که میزان شاخساره‌زایی در این دو نوع ریزنمونه تفاوت معنی‌داری نداشت. ولی در میزان انگیزش پینه و ریشه‌زایی این دو نوع ریزنمونه پاسخ‌های متفاوتی داشتند. البته احتمالا سطح هورمون‌های درون‌زا شاخه یکساله نسبت به شاخه یکساله در گز شاهی بیشتر می‌باشد که پینه‌زایی و ریشه‌زایی بیشتری هم در این ریزنمونه مشاهده شد. استفاده از غلظت‌های یک تا دو میلی‌گرم در لیتر BA به همراه غلظت‌های کمی از یک اکسین ضعیف مانند NAA و یا IAA به‌منظور شاخساره‌زایی در گونه‌های مختلف گز مانند *T. tetrandra*، *T.gallica* و *T. chinensis* گزارش شده است (Cheng and Zhou, 2001; Han and Zhou, 2010; Xian-fang, 2009; Lucchesini *et al.*, 1993; Orabi *et al.*, 2011) که با نتایج این آزمایش همسو می‌باشد.

در کل می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از مواد گیاهی جوان‌تر مانند شاخه فصل جاری، محلول‌پاشی پایه مادری با قارچ‌کش و استفاده از اسانس ائوجینول ۰/۰۱ درصد در محیط کشت می‌تواند با کاهش پدیده قهوه‌ای شدن و کنترل مناسب آلودگی‌ها، ریزازدیادی درختچه گز شاهی را با استفاده از تنظیم کننده‌های مناسب فراهم کند. مناسب‌ترین تنظیم‌کننده رشد برای پینه‌زایی غلظت یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و برای القای شاخساره محیط کشت دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در ریزنمونه‌های حاصل از شاخه سال جاری و یکساله درختچه گز شاهی توصیه می‌گردد. نتایج حاصل از بهینه نمودن شرایط ازدیاد درون‌شیشه‌ای درختچه گز شاهی با استفاده از شیوه‌نامه ارائه شده می‌تواند در جنبه‌های پژوهشی مانند بررسی انواع مقاومت‌ها، بستری

---

۱. *Carya illinoinensis*

برای دست‌ورزی‌های ژنتیکی و غیره کاربرد داشته باشد.

منابع مورد استفاده

– Abravesh, Z., Assareh, M. and Emam, M., 2019. Micropropagation of Eucalyptus citriodora H., Iranian journal of regelands and forests plant breeding and genetic research, 27(1): 86-97.
– Acheampong, S., Galyuon, I.K. and Asare, A.T., 2015. Effects of sterilization protocols, benzylaminopurine and type of explants on growth initiation of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] cultures. Journal of Basic and Applied Sciences, 1: 50-65.
– Adorjan, B. and Buchbauer, G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour and Fragrance Journal, 25: 407-426.
– Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils–a review. Food and chemical toxicology, 46: 446-475.
– Campaniello, D., Corbo, M. R., and Sinigaglia, M. 2010. Antifungal activity of eugenol against Penicillium, Aspergillus, and Fusarium species. Journal of Food Protection, 73:1124-1128.
– caryophyllata (Syzygium aromaticum L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research, 21(6):501-506.
– Castro, A.H.F., Braga, K.D.Q., Sousa, F.M.D., Coimbra, M.C. and Chagas, R.C.R., 2016. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.(Malpighiaceae). Revista Ciência Agronômica, 47: 143-151.
– Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., and Bakhrouf, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 21(6): 501-506.
– Cheng, L. and Zhou, G.Y., 2001. Tissue Culture and Rapid Propagation of *Tamarix chinensis* Lour [J]. Journal of Shanghai Teachers University, 2: 12-16.
– Çölgeçen, H., Çalişkan, U.K. and Toker, G., 2011. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. Turkish Journal of Biology, 35: 513-520.
– Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S., Cella, R., 1995. Factors affecting Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation in several black poplar clones. Plant Cell Tiss Org, 43:215–222.
– Deein 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, Engineering and Technology 78: 1038-1041.
– Doran, P.M., 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. Biotechnology and bioengineering, 103: 60-76.
– Duan, H., Ding, W., Song, J., Xu, J., Wang, H., Zhu, Y., Liu, W. and Zhou, Y., 2016. Roles of plant growth substance in callus induction of *Achyranthes bidentata*. Research in Plant Biology, 6: 6-13.
– Gatica Arias, A.M., Muñoz Valverde, J., Ramírez Fonseca, P. and Valdez Melara, M., 2010. *In vitro* plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of N6-benzylaminopurine and adenine sulphate. Electronic journal of Biotechnology, 13: 6-7.
– Gill, A.O., and Holley, R.A. 2006. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. International Journal of Food Microbiology,108:1-9.
– Han L.N., and Zhou, F.Q., 2010. *In Vitro* Regeneration of One-step Seedling Formation for *Tamarix chinensis* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 11: 5-9.
– Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A., 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. Plant Cell, 25(9): 3159-73.
– Khan, N., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbasi, N., Ejaz, S. and Anjum, M., 2015. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. OENO One, 49: 37-45.
– Laukkanen, H., Häggman, H., Kontunen-Soppela, S. and Hohtola, A., 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: role of peroxidase and polyphenol oxidase. Physiologia Plantarum, 106: 337-343.
– López-Herrera, C. and Zea-Bonilla, T., 2007. Effects of benomyl, carbendazim, fluazinam and thiophanate methyl on white root rot of avocado. Crop Protection, 26: 1186-1192.
– Lucchesini, M., Mensuali-Sodi, A. and Vitagliano, C., 1993. Micropropagation of *Tamarix gallica* from nodal explants of mature trees. Plant cell, tissue and organ culture, 35: 195-197.
– Mahmoud, S.N. and Al-Ani, N.K., 2016. Effect of

economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. African Journal of Biotechnology, 8: 5395-5399.
– Oyedemi, S., Okoh, A., Mabinya, L., Pirochenva, G. and Afolayan, A., 2009. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,[alpha]-terpineol and g-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology, 8: 1280-1286.
– Ozyigit, I.I., 2008. Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton *(Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. African Journal of Biotechnology, 7: 1145-1150.
– Palacio, L., Cantero, J.J., Cusidó, R.M., and Goleniowski, M.E., 2012. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). Plant science, 193: 1-7.
– Rodriguez, A.P., and Wetzstein, H.Y., 1998. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoinensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Protoplasma, 204: 71-83.
– Sazmand, M., and Safarnezhad, A., 2016. Callus induction, regeneration and proliferation of Berberis vulgaris var. asperma using In vitro technique', Iranian journal of regelands and forests plant breeding and genetic research, 24(1): 92-101.
– Shahavi, M.H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R.L., and Darzi, G.N., 2015. Clove oil nanoemulsion as an effective antibacterial agent: Taguchi optimization method. Desalination and Water Treatment, 57: 1-12.
– Shields, R., Robinson, S.J., and Anslow, P.A., 1984. Use of fungicides in plant tissue culture. Plant Cell Reports, 3: 33-36.
– Taghizadeh, M., Babalar, M., Zamani, Z., Naderi, R., and Askari M.A. 2006. Direct and indirect shoot regeneration of *Tulipa gesneriana* L. Apeldoorn in *In vitro* culture. Agricultural sience of Iran, 37(6):1031-1039.
– Taghizadeh, M., and 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.
– Taghizadeh, M., Solgi, M., and Shahrjerdi, I. 2016. Essential oil as an alternative to chemical antimicrobial agent for the culture of strawberry in vitro. Journal of Horticulture, Forestry and Different Sterilization Methods on Contamination and Viability of Nodal Segments of *Cestrum nocturnumL*. International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB), 4: 4-9.
– Manganyi, M.C., Regnier, T., and Olivier, E.I. 2015. Antimicrobial activities of selected essential oils against Fusarium oxysporum isolates and their biofilms. South African Journal of Botany, 99:115-121.
– Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Cmelik, Z., Puskar, B. and Jurkovic, Z., 2013. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of' OBLACINSKA' sour cherry. Journal of Agricultural Sciences, 58: 117-126.
– Mokbel S.A., Khalil A.A., and El-Shazly, M.A. 2017. Efficiency of eugenol oil nanoemulsion against Banana bunchy top virus and contamination with fungi in plant tissue culture. Arab Journal Biotechnology, 20(1): 33-50.
– Morcia, C., Malnati, M., and Terzi, V. 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. Food Additives and Contaminants, 29:415-422.
– Nakagawara, S., Goto, T., Nara, M., Ozawa, Y., Hotta, K. and Arata, Y., 1998. Spectroscopic Characterization and the pH Dependence of Bactericidal Activity of the Aqueous Chlorine Solution. Analytical Sciences, 14: 691-698.
– Naz, S., and Khatoon, K., 2014. The effect of auxins on callus induction in achyranthes aspera. Pakistan Journal of Botany, 46: 2203-2207.
– Noruzpour, M., Zare, N., Sheikhzadeh-Mosadegh, P., and Asghari-Zakaria, R., 2019. The effect of auxin and signaling compounds on growth and production of secondary metabolites in vitro cultures of Whortleberry (Vaccinium arctostaphylos L.). Iranian journal of regelands and forests plant breeding and genetic research, 27(1):45-58.
– Orabi, M.A., Taniguchi, S., Terabayashi, S., and Hatano, T., 2011. Hydrolyzable tannins of tamaricaceous plants. IV: Micropropagation and ellagitannin production in shoot cultures of *Tamarix tetrandra*. Phytochemistry, 72: 1978-1989.
– Osman, N.I., Sidik, N.J., and Awal, A., 2016. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6: 143-147.
– Oyebanji, O., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N., Idris, M., Nnodi, U.N., Afolabi, A.S., and Ogbadu, G.H., 2009. Simple, effective and

Biotechnology, 20(4): 99- 106.
– Xian-fang, L., 2009. Application of BA and NAA in the Rapid Propagation *in vitro* of *Tamarix chinensis* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 10: 22-25.
– Yildiz, M., and Er, C., 2002. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). The science of nature, 89: 259-261.

Investigation of the effect of various sterilization procedures for successful callus and shoot proliferation of *Tamarix aphylla*

P. Karimi[1], M. Taghizadeh[2*], M. Solgi[3], A. Khadivi[3]

1- M.Sc. Graduated, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Arak University, Arak, I.R. Iran.
2*- Corresponding author, Assist. Prof., Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Arak University, Arak, I.R. Iran. Email: m-taghizadeh@araku.ac.ir
3- Assoc. Prof. Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Arak University, Arak, I.R. Iran.

Received: 9.07.2019 Accepted: 3.02.2020

Abstract

Tamarix aphylla is used as a windbreaker, shade tree and ornamental plant in gardens and urban landscape. The browning phenomenon is an important inhibitory factor in various stages such as disinfection and regeneration of *Tamarix aphylla*. To optimize the disinfection conditions and control the browning process of the explants, experiments were carried out with disinfectants and eugenol compound to disinfect the current and annual stem explants. Then, callus induction was studied in a medium complemented by two types of auxins (2,4-D and NAA). In the third experiment, the optimization of shoot induction medium was investigated on current and one year old shoots explants. The best disinfection treatment to control fungal and bacterial contamination and phenol secretion from the current explants was obtained using a 60-second ethanol application combined with 10 minutes of 20% sodium hypochlorite disinfection. Spraying of donor plants with thiophanate methyl fungicide was also able to reduce fungal contamination by almost 50% compared to the control. Application of 0.01% eugenol in the medium by injection reduced the contamination and phenol secretion from the explants. The highest survival and callus induction was acquired at the concentration of 1 mgL^{-1} 2, 4-D, in the shortest time. Shoot induction in the explants of current and one year old shoots was obtained in the culture medium containing 2 mgL^{-1} BA and 0.5 mgL^{-1} IBA In conclusion, the application of younger plant materials, spraying of donor plant with fungicides and the use of 0.01% eugenol in the medium can reduce the browning phenomenon and proper control of contamination and finally could provide micropropagation of *Tamarix aphylla* shrubs using appropriate growth regulators

Keywords: *Tamarix aphylla*, Browning, Disinfection, Eugenol, Fungicide, Micropropagation.