

## بررسی روش‌های ضدعفونی سطحی ریزنمونه ریزوم به‌منظور کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در باززایی گیاه آلسترومریا رقم بالانس در شرایط درون‌شیشه‌ای

### Evaluation of Surface Disinfection Methods of Rhizome Derived Explant in order to Control of Fungal and Bacterial Contaminations in Regeneration of *Alstroemeria* cv. "Balance" under *In Vitro* Conditions

مریم بیگی هرچگانی<sup>۱\*</sup>، حسین نظریان<sup>۱</sup>، محمدعلی ابراهیمی<sup>۲</sup>، محمود اطرشی<sup>۳</sup> و ابراهیم لطیفی‌خواه<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵

(مقاله کوتاه پژوهشی)

#### چکیده

در این پژوهش، تأثیر ترکیبات ضدعفونی‌کننده مختلف (الکل اتیلیک، هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه، ستریمید و کلرگزیدین، دتول، سفالکسین، پرمنگنات، ریدومیل و فسفیت پتاسیم) بر کنترل آلودگی ریزنمونه‌های ریزوم رقم بالانس آلسترومریا مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت، درصد آلودگی ریزنمونه‌ها به‌صورت روزانه در تیمارها بررسی و ثبت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار و سه تکرار مورد طراحی قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام گرفت. نتایج نشان داد که تیمار (C) Et.Cl.Cf. (سفالکسین در دو مرحله)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به‌مدت ۲۰ دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت ۱۵ دقیقه، بهترین روش ضدعفونی برای کنترل آلودگی باکتریایی است. تیمارهای (R) ET.Dt.Cl (دتول + هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه، دتول رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۴۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد یا محلول توئین به‌مدت ۱۰ دقیقه، و (T) ET.Cl (الکل اتیلیک ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۴۰ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به‌مدت ۳۵ دقیقه، بهترین تأثیر را در کنترل آلودگی قارچی داشتند. هم‌چنین تیمار (L) Et.Cc. (الکل اتیلیک ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه، در کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی بی‌تأثیر بود.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، آلسترومریاسه، استریلیزاسیون

۱ و ۲. به‌ترتیب کارشناسی ارشد و استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، واحد کرج، کرج، ایران  
۳. دانشیار، بخش کشت بافت، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، نجف‌آباد، اصفهان، ایران  
۴. مربی، بخش باغبانی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
\*: نویسنده مسئول  
Email: maryam.baigi@yahoo.com

## مقدمه

ریزنمونه‌های حاصل از ریزوم ارقام کارالیس و بردئوکس<sup>۱</sup>، تأثیر ترکیبات ضدعفونی‌کننده مختلفی چون هیپوکلریت سدیم، کلریدجیوه، نانوذرات نقره، آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، پنی‌سیلین، سفوتاکسیم و قارچ‌کش کاربندازیم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد تیمار ریزنمونه‌ها با استفاده از قارچ‌کش کاربندازیم با غلظت چهار درصد، ضدعفونی با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت ۲۰ دقیقه برای رقم کارالیس و ترکیب ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت ۲۰ دقیقه و سپس انتقال به محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین برای رقم بردئوکس کم‌ترین میزان آلودگی را در برداشته است. درحالی که کاربرد نانو ذرات نقره جهت کنترل آلودگی در هر دو رقم کارالیس و بردئوکس موفقیت‌آمیز نبوده است. با توجه به این که آلسترومریا جزو پنج گیاه اول شاخه‌بریده در دنیا به شمار می‌رود، تولید ریزنمونه‌های عاری از آلودگی به‌منظور استفاده در برنامه‌های کشت بافت این گیاه از اهمیت فراوانی برخوردار است. در پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه تاکنون کنترل کامل آلودگی‌های باکتریایی و قارچی در ریزنمونه حاصل از ریزوم آلسترومریا صورت نگرفته است. بنابراین هدف از اجرای این پژوهش، تولید ریزنمونه ضدعفونی شده و عاری از آلودگی‌های باکتریایی و قارچی با استفاده از ترکیباتی چون ستریمید، کلرگزیدین، دتول، پرمنگات، قارچ‌کش ریدومیل و ترکیب فسفیت پتاسیم بوده است که برای نخستین بار در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته‌اند. دسترسی آسان، صرفه اقتصادی، عدم اثر مخرب زیست‌محیطی در انتخاب ترکیبات فوق جهت بررسی قابلیت کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی محیط‌کشت نقش به‌سزایی داشته‌اند.

آلسترومریا<sup>۱</sup> گیاه تک‌لپه و دگر گرده‌افشان از خانواده آلسترومریاسه<sup>۲</sup> است که در اصل خاستگاه آن از آمریکای جنوبی می‌باشد (خالقی<sup>۳</sup> و همکاران ۲۰۰۸). در حال حاضر در میان گل‌های شاخه‌بریده، آلسترومریا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گل‌ها در بازارهای بین‌المللی شناخته می‌شود (کیاری و بریجن<sup>۴</sup>، ۲۰۰۰). آلسترومریا یک محصول جدید در بازار دنیا می‌باشد که علاقه به کشت آن هنوز ادامه دارد، این امر به شرایط کشت نسبتاً آسان و عدم نیاز به احتیاجات خاص برمی‌گردد. این گیاه دارای گل‌های زیبا با ماندگاری طولانی می‌باشد که علاقه به کشت آن را دو چندان نموده است (نات<sup>۵</sup> و همکاران، ۲۰۰۶). تکنیک کشت بافت در زمینه گیاهان زینتی، امکان بازرایی تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های جدید را ممکن ساخته است؛ بنابراین توانایی تجاری‌سازی تولید گیاهان سالم و یکنواخت را میسر خواهد نمود (نوت و دون<sup>۶</sup>، ۲۰۰۶). ریزازدیادی گیاهان باغی در سال‌های اخیر توسعه زیادی یافته است. در خصوص آلسترومریا، نرخ تکثیر پایین، زمان‌بر بودن فرآیند تولید، محدودیت‌های فصلی و امکان انتقال بیماری‌های ویروسی از مهم‌ترین مشکلات تکثیر سنتی می‌باشند (زین<sup>۷</sup>، ۱۹۹۵). موفقیت در روش‌های بازرایی وابسته به فاکتورهای متعددی مانند ژنوتیپ، محیط‌کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه است (لین<sup>۸</sup> و همکاران، ۱۹۹۷ و ۲۰۰۰). جوانه‌های ریزوم برگرفته از گیاهان مورد رشد در شرایط غیر آزمایشگاهی با طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا آلوده بوده که عمدتاً از نوع خاکزی می‌باشند. آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مشکلات اصلی استفاده از اندام‌های زیرزمینی هستند (خالقی و همکاران، ۲۰۰۸)؛ (پدرسون و براندت<sup>۹</sup>، ۱۹۹۲). در صورت عدم اعمال روش‌های مؤثر ضدعفونی، این عوامل بیماری‌زا به محیط‌کشت بافت غنی از مواد غذایی راه یافته و به‌شدت تکثیر می‌شوند. در چنین شرایطی، معمولاً کشت از دست خواهد رفت. هنگامی که هدف از کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی می‌تواند خسارت جبران‌ناپذیری وارد سازد (لین و همکاران، ۲۰۰۰؛ رد<sup>۱۰</sup> و همکاران، ۱۹۹۴). شهریاری و همکاران (۱۳۹۰) به‌منظور بررسی میزان کنترل آلودگی

1. *Alstroemeria*
2. *Alstroemeriaceae*
3. Khaleghi
4. Chiari and Bridgen
5. Nhut
6. Nhut and Don
7. Zaayen
8. Lin
9. Pedersen and Brandet
10. Red

جدول ۱: مراحل مختلف آزمایش‌ها به منظور از بین بردن آلودگی در ریزنمونه‌های تهیه شده از ریزوم؛ ریزنمونه‌ها پیش از قرار گرفتن در معرض تیمارهای مربوطه، به طور کامل با آب شهری شسته شدند، و حداقل سه مرتبه توسط آب مقطر آبکشی گردیده، در محیط کشت قرار گرفتند

Table 1: Different stages of experiments in order to eliminate contamination in explants derived from rhizomes; explants were washed thoroughly under running tap water, before expose to related treatments and were rinsed at least three times with sterile distilled water, before placed in media culture

شماره Issue	تیمارهای ضدعفونی انجام پذیرفته Accomplished disinfection treatments
Et. (A); Control	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه 70% Ethylic alcohol for one min
Cf.CI. Et (B)	(سفالکسین پیش از هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه (Cephalexin before sodium hypochlorite); 70% Ethylic alcohol for one min, 500 mg diluted Cephalexin in 400 milliliter sterile distilled water for a quarter, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min
Et.CI.Cf. (C)	(سفالکسین پس از هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه (Cephalexin after sodium hypochlorite); 70% Ethylic alcohol for one min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for a quarter, 500 mg diluted Cephalexin in 400 milliliter sterile distilled water for a quarter
Et.Cf.CI.Cf. (D)	(سفالکسین در دو مرحله)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه (Cephalexin in two stages); 70% Ethylic alcohol for one min, 500 mg diluted Cephalexin in 400 milliliter sterile distilled water for a quarter, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min, 500 mg diluted Cephalexin in 400 milliliter sterile distilled water for a quarter.
Et.CI.Pph <sub>1</sub> . (E)	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه، تزریق ۲۰ پی‌پی‌ام فسفیت پتاسیم (طی ساخته شدن محیط کشت) 70% Ethylic alcohol for one min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min, injection of 20 ppm potassium phosphite (during construction of culture medium)
Et.CI.Pph <sub>2</sub> . (F)	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه، تزریق ۴۰ پی‌پی‌ام فسفیت پتاسیم (طی ساخته شدن محیط کشت) 70% Ethylic alcohol for one min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min, injection of 40 ppm potassium phosphite (during construction of culture medium)
Et.CI.Pph <sub>3</sub> . (G)	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه، تزریق ۶۰ پی‌پی‌ام فسفیت پتاسیم (طی ساخته شدن محیط کشت) 70% Ethylic alcohol for one min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min, injection of 60 ppm potassium phosphite (during construction of culture medium)
Et.Mm <sub>1</sub> .CI. (H)	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۱۰ گرم ریدومیل رقیق شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه 70% Ethylic alcohol for one min, 10 g diluted Ridomil in 100 ml sterile distilled water for 1 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min
Et.Mm <sub>2</sub> .CI. (I)	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۲۰ گرم ریدومیل رقیق شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه 70% Ethylic alcohol for one min, 20 g diluted Ridomil in 100 ml sterile distilled water for 1 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min
Et.Mm <sub>3</sub> .CI. (J)	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۳۰ گرم ریدومیل رقیق شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه 70% Ethylic alcohol for one min, 30 g diluted Ridomil in 100 ml sterile distilled water for 1 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min.
Et.Mm.Cf.CI. (K)	(ریدومیل، سفالکسین)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۲۰ گرم ریدومیل رقیق شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱ دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه (Ridomil + Cephalexin); 70% Ethylic alcohol for one min, 20 g diluted Ridomil in 100 ml sterile distilled water for 1 min, 500 Mg diluted Cephalexin in 400 ml sterile distilled water for a quarter, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min
Et.Cc. (L)	(ستریمید و کلرهگزیدین)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرهگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه (Cetrimide and chlorhexidine); 70% Ethylic alcohol for one min, Cetrimide and chlorhexidine 1:10 diluted in sterile distilled water for 30 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min

ادامه جدول ۱: مراحل مختلف آزمایش‌ها به منظور از بین بردن آلودگی در ریزنمونه‌های تهیه شده از ریزوم؛ ریزنمونه‌ها پیش از قرار گرفتن در معرض تیمارهای مربوطه، به طور کامل با آب شهری شسته شدند، و حداقل سه مرتبه توسط آب مقطر آبکشی گردیده، در محیط کشت قرار گرفتند

Table 1 continued: Different stages of experiments in order to eliminate contamination in explants derived from rhizomes; explants were washed thoroughly under running tap water, before expose to related treatments and were rinsed at least three times with sterile distilled water, before placed in media culture

شماره Issue	تیمارهای ضدعفونی انجام پذیرفته Accomplished disinfection treatments
Et.Cc.Cl <sub>1</sub> . (M)	(ستریمید و کلرهگزیدین، هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرهگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرفشویی به مدت ۱۰ دقیقه (Cetrimide and chlorhexidine + sodium hypochlorite); 70% Ethylic alcohol for one min, Cetrimide and chlorhexidine 1:10 diluted in sterile distilled water for 30 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 10 min
Et.Cc.Cl <sub>2</sub> . (N)	(ستریمید و کلرهگزیدین، هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرهگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد یک قطره محلول توئین یا مایع ظرفشویی به مدت ۱۵ دقیقه (Cetrimide and chlorhexidine + sodium hypochlorite); 70% Ethylic alcohol for one min, Cetrimide and chlorhexidine 1:10 diluted in sterile distilled water for 30 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 15 min
Et.Pph.Mm.Cf. (O)	(فسفیت پتاسیم + ریدومیل + سفالکسین)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۲۰ گرم ریدومیل رقیق شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲ دقیقه، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه (Potassium phosphite + Ridomil + Cephalixin); 70% Ethylic alcohol for one min, 20 g Ridomil diluted in 100 ml sterile distilled water for 2 min, 500 Mg diluted Cephalixin in 400 ml sterile distilled water for a quarter
Et.Pm.Cl. (P)	(پرمنگنات)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۰/۴ گرم پرمنگنات رقیق شده در ۴۰۰ سی سی آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرفشویی به مدت ۲۰ دقیقه (Permanganate); 70% Ethylic alcohol for one min, 0.4 g diluted permanganate in 400 ml strile distilled water for 15 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min
Et.Mc.(Q)	(کلریدجیوه)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، محلول ۰/۱ کلریدجیوه به مدت ۷ دقیقه (Mercuric chloride); 70% Ethylic alcohol for one min, 0.1% mercuric chloride solution for seven minutes
Et.Dt.Cl. (R)	(دتول + هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، دتول رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۴۰ به مدت ۳۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه (Dettol + sodium hypochlorite); 70% Ethylic alcohol for one min, Dettol 1:40 diluted in sterile distilled water for 30 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 10 min
Et.Dt. (S)	(دتول)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، دتول رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۴۰ به مدت ۳۰ دقیقه (Dettol); 70% Ethylic alcohol for one min, Dettol 1:40 diluted in sterile distilled water for 30 min
Et.Cl. (T)	الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۴۰ درصد + یک قطره. محلول توئین یا مایع ظرفشویی به مدت ۳۵ دقیقه 70% Ethylic alcohol for one min, 40% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 35 min

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت نوید رویش سپاهان واقع در اصفهان اجرا گردید. قطعات ریزومی آلسترومریا رقم بالانس<sup>۱</sup> از گلخانه تهیه و جهت اعمال تیمارهای مختلف ضدعفونی مورد استفاده قرار گرفت.

### تیمارهای ضدعفونی

در این آزمایش، تیمارهای مختلف ضدعفونی جهت بررسی کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در ریزنمونه‌های قطعات ریزوم آلسترومریا مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). الکل اتیلیک ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم، کلریدجیوه، ستریمید و کلرهگزیدین، دتول، سفالکسین، پرمنگنات، قارچ کش ریدومیل و نیز ترکیب فسفیت پتاسیم جهت القاء سنتز فیتوالکسین‌ها در گیاه برای افزایش مقاومت در مواجهه با آلودگی باکتری و

قارچی، در آزمایشات جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند. انتخاب درصد و غلظت ترکیبات و زمان براساس آزمایشات مقدماتی صورت گرفت.

### آماده سازی ریزنمونه‌ها

به منظور تهیه ریزنمونه و پس از خروج گیاه از بستر کشت، ریزوم‌های در حال رشد فعال با استفاده از یک چاقوی تیز برش یافته و برای حذف خاک و گردوغبار، به مدت ۲۰ دقیقه زیر آب شهری شسته شدند. پس از اعمال هریک از تیمارهای ضدعفونی، قطعات ریزومی در زیر لامینار فلو و تحت شرایط استریل، سه مرتبه با آب مقطر دوبار استریل، آبکشی گردیدند. جوانه‌های جانبی و انتهایی (با طول چهار الی شش میلی متر) از قطعات ریزومی تهیه و به عنوان ریزنمونه در محیط کشت ام اس<sup>۲</sup> کشت گردیدند. در هر ظرف کشت، تعداد شش ریزنمونه کشت شد. ظروف کشت در اتاق رشد در دمای ۲۰ ± ۲۲ °C و فتوپریود

2. MS: Murashige and Skoog

1. Balance

ضعفونی از لحاظ مقاومت به بروز آلودگی قارچی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲). این مسئله نشان می‌دهد که روش‌های مختلف ضدعفونی ریزنمونه‌های ریزوم بر ایجاد مقاومت در بروز آلودگی قارچی اثر مثبتی نداشته است.

۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند. به دلیل این‌که هدف پژوهش حاضر دستیابی به بهترین روش ضدعفونی در کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی در ریزنمونه‌های ریزوم بود، از واکشت تیمارهای آلوده اجتناب گردید.

## داده‌برداری و تجزیه و تحلیل آماری

مشاهدات در خصوص زمان وقوع آلودگی و نیز شدت آلودگی‌های قارچی و باکتریایی (تعیین شدت آلودگی با درجه بندی یک تا چهار، به ترتیب خفیف تا شدید) با استفاده از روش مشاهده‌ی تجربی و بررسی میکروسکوپی در موارد مقتضی، به صورت روزانه ثبت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار (جدول ۱) و سه تکرار طراحی شد. داده‌ها با استفاده از تفریق میانگین و تقسیم توسط انحراف استاندارد در نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۶ نرمال‌سازی و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹ انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام گرفت.

## نتایج

### ۱. اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی بر مقاومت به بروز

#### آلودگی قارچی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای مختلف

جدول ۲: تجزیه واریانس؛ اثر تیمارهای مختلف بر روی شاخص‌های مورد نظر

Table 2: Analysis of variance of the effect of different treatments on the considered indicators

منبع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	مقاومت به بروز آلودگی قارچی Resistance to fungal infection outbreak	مقاومت به بروز آلودگی باکتریایی Resistance to bacterial infection outbreak	شدت آلودگی قارچی Fungal infection intensity	شدت آلودگی قارچی Bacterial infection intensity
تیمار Treatment	19	0.44 <sup>ns</sup>	0.78 <sup>*</sup>	2.93 <sup>**</sup>	2.29 <sup>**</sup>
خطا Error	40	0.5	0.38	0.73	0.57
درصد ضریب تغییرات CV (%)		6.63	5.88	7.69	6.85

ns: ns و \*\*: به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح یک و پنج درصد

ns, \*\* and \*: Not significant, Significantly different at 1% and 5% level of probability, respectively

قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، Et.Pm.Cl (P)؛ (پرمنگنات)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۰/۴ گرم پرمنگنات رقیق شده در ۴۰۰ سی‌سی آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف‌شویی به مدت ۲۰ دقیقه، Et. (A)؛ الکل

### ۳. اثر تیمارهای مختلف ضدعفونی بر مقاومت به بروز

#### آلودگی باکتریایی

بین تیمارهای مختلف از لحاظ مقاومت به بروز آلودگی باکتریایی در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). در هیچ‌یک از تیمارهای Et.Cl.Cf. (C)؛ (سفالکسین پس از هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک

۳۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت ۱۵ دقیقه و نیز تیمارهای ضد عفونی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۴۰ درصد، کاربرد ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه قبل، بعد و همچنین کاربرد سفالکسین در دو زمان قبل و بعد از مرحله ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت ۲۰ دقیقه و نیز ضد عفونی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و کلریدجیوه به میزان ۰/۱ گرم در لیتر به مدت هفت دقیقه، می توان گفت کاربرد سفالکسین، ستریمید و کلرهگزیدین، و کلریدجیوه و سپس ضد عفونی ریزومها در هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت ۲۰ دقیقه، جهت از بین بردن آلودگی باکتریایی مؤثر واقع گردید، اما چون تیمار الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۴۰ درصد به مدت ۳۵ دقیقه نیز در کنترل آلودگی باکتریایی نتیجه مشابهی داشت، بنابراین این روش به دلیل سهولت و مقرون به صرفه بودن، جهت از بین بردن آلودگی باکتریایی توصیه می شود. با بررسی نتایج فوق، روش ضد عفونی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرهگزیدین رقیق شده در آب مقطر نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه که ریزومها بعد از شستشو در آب مقطر در محلول هیپوکلریت سدیم سه درصد و یک قطره مایع توئین به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شدند. به مدت ۱۵ دقیقه نیز در هیپوکلریت سدیم سه درصد ضد عفونی گردیدند، به عنوان یک روش واحد در کنترل آلودگی معرفی می گردد. در مطالعه‌ای مشابه با این پژوهش نانوذرات نقره جهت کنترل آلودگی در هر دو رقم کارالیس و بردئوکس موفقیت آمیز نبوده و کاربرد سایر مواد نظیر، آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین، پنی سیلین، سفوتاکسیم و قارچ کش کاربندازیم در هر دو رقم منجر به بروز کمترین میزان آلودگی شده است (شهریاری و همکاران، ۱۳۹۰). با این که در تحقیق حاضر از آنتی بیوتیک سفالکسین و نیز قارچ کش ریدومیل استفاده گردید، اما پاسخ مواد جدید (دتول، ستریمید و کلرهگزیدین) جهت کنترل آلودگی قابل توجه بوده و می توان گفت، این مواد جایگزین مناسبی برای قارچ کش‌ها و آنتی بیوتیک‌ها هستند. همچنین مزیت دیگر این تحقیق، مدت زمان کم تر ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم نسبت به تحقیق شهریاری و همکاران بوده است. کنترل همزمان آلودگی‌های قارچی و باکتریایی با استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و قارچ کش‌ها با توجه به عدم اطلاع از نوع باکتری و قارچ نه تنها به طور کامل میسر نیست، بلکه بسیار زمان بر و پرهزینه بوده و استفاده از مواد شیمیایی، خطر احتمال وقوع تنوع سوماکلونال را نیز افزایش خواهد داد. در پژوهش‌های

اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه (تیمار شاهد)، Cf.Cl.Et. (B)؛ (سفالکسین پیش از هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف شویی به مدت ۲۰ دقیقه، Et.Dt. (S)؛ (دتول)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، دتول رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۴۰ به مدت ۳۰ دقیقه، و Et.Cf.Cl.Cf. (D)؛ (سفالکسین در دو مرحله)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف شویی به مدت ۲۰ دقیقه، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه آلودگی باکتریایی مشاهده نگردید.

#### ۴. اثر تیمارهای مختلف ضد عفونی بر کنترل شدت آلودگی باکتریایی

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای مختلف از لحاظ شدت آلودگی باکتریایی در سطح یک درصد اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۲). همان طور که در بند سه اشاره گردید؛ پس از تیمارهای Et.Cl.Cf. (C)، Et.Pm.Cl (P)، Et.(A)، Et.(B)، Cf.Cl.Et. (S)، Et.Dt. (S) و Et.Cf.Cl.Cf. (D) که در آن‌ها آلودگی قارچی بروز پیدا نکرد، به ترتیب تیمارهای Et.Cc.Cl (M)؛ (ستریمید و کلرهگزیدین، هیپوکلریت سدیم)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرهگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد + یک قطره محلول توئین یا مایع ظرف شویی به مدت ۱۰ دقیقه، Et.Pph.Mm.Cf. (O)؛ (فسفیت پتاسیم + ریدومیل + سفالکسین)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۲۰ گرم ریدومیل رقیق شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲ دقیقه، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفالکسین رقیق شده در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه، و Et.Mc. (Q)؛ (کلریدجیوه)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، محلول ۰/۱ گرم در لیتر کلریدجیوه به مدت هفت دقیقه، کمترین آلودگی را داشتند.

#### بحث

با توجه به عدم بروز آلودگی باکتریایی در روش ضد عفونی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرهگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت

روش الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه به کار گرفته شد، سپس ستریمید و کلرگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت که ریزومها بعد از شستشو با آب مقطر، به مدت ۱۵ دقیقه نیز در محلول هیپوکلریت سدیم سه درصد و یک قطره مایع توئین به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج آزمایش پیشنهاد می شود جهت کنترل آلودگی (قارچی و باکتریایی) در ریزنمونه های حاصل از ریزوم آلسترومریا، به ترتیب روش های (S). Et.Dt.؛ (دتول)؛ الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، دتول رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۴۰ به مدت ۳۰ دقیقه، و (M). Et.Cc.Cl1.؛ ستریمید و کلرگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه و انتقال ریزومها به محلول هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، پس از شستشو در آب مقطر مورد استفاده قرار گیرند. انتظار می رود که روش های ضدعفونی مزبور تأثیر به سزایی در کنترل آلودگی در سایر ارقام نیز داشته باشند. به منظور ادامه این زمینه تحقیقاتی، اثر تیمارهای مناسب این پژوهش را می توان بر کنترل آلودگی در سایر ریزنمونه ها در آلسترومریا نیز مورد بررسی قرار داد.

مشابه با تحقیق حاضر نیز از هیپوکلریت سدیم به تنهایی و با غلظت ها و زمان های متفاوت در سایر ارقام استفاده گردیده که در این پژوهش نیز هیپوکلریت سدیم به تنهایی در غلظت ۴۰ درصد و مدت ۳۵ دقیقه، در تمام تکرارها به طور کامل از بروز آلودگی باکتریایی جلوگیری نمود.

ظاهراً غلظت ۴۰ درصد هیپوکلریت سدیم را می توان به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفت؛ زیرا در بازایی آلسترومریا رقم جامائیکا، هیپوکلریت سدیم تجاری در غلظت ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) منجر به کمترین میزان آلودگی (۱۰-۵ درصد) در ریزنمونه های برگ، ساقه و گل آذین شد، اما میزان آلودگی در ریزومها، به طور مشخص بالای ۶۰ درصد بوده و به همین دلیل این ماده گیاهی به عنوان ریزنمونه در نظر گرفته نشد (سانتوس<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۵). ضدعفونی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، ستریمید و کلرگزیدین رقیق شده در آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ به مدت ۳۰ دقیقه، در کاهش آلودگی باکتریایی و قارچی اثری نداشت و روش ضدعفونی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۴۰ درصد به مدت ۳۵ دقیقه نیز، تنها در کنترل آلودگی باکتریایی مؤثر واقع شد. کاربرد دو ماده هیپوکلریت سدیم و ستریمید و کلرگزیدین با غلظت و زمان مناسب در یک روش ترکیبی؛ (M). Et.Cc.Cl1. منجر به امکان کنترل آلودگی های قارچی و باکتریایی گردید که طی این

### منابع

- شهریاری، ا. غ.، باقری، ع.، شریفی، ا. و مشتاقی، ن. ۱۳۹۰. کنترل آلودگی ریزنمونه های ریزوم گیاه آلسترومریا (*Alstroemeria* sp.) در شرایط آزمایشگاهی. نشریه علوم باغبانی (دانشگاه فردوسی مشهد)، ۲۵ (۱): ۱۰۹-۱۱۵.
- Khaleghi, A., Sahraroo, A., Rasoulnia, I. N. and Ataei, R. 2008. *In vitro* propagation of *Alstroemeria* cv. 'Fuego', American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 3: 492-497.
- Lin, H. S., De Jeu, M. J. and Jacobsen, E. 2000. The application of leafy explant micropropagation protocol in enhancing the multiplication efficiency of *Alstroemeria*, Horticultural Science, 85: 307-318.
- Chiari, A. and Bridgen, M. P. 2000. Rhizome splitting: a new micropropagation technique to increase in vitro propagule yield in *Alstroemeria*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62: 39-46.
- Lin, H. S., De Jeu, M. J. and Jacobsen, E. 1997. Direct shoot regeneration from excised leaf explants of *In vitro* grown seedlings of *Alstromermeria* L., Plant Cell Tissue and Organ Culture, 16: 770-774.
- Pedersen, C. and Brandt, K. 1992. A method for disinfection of underground rhizome tips of *Alstroemeria* and *Heliconia*, Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science, 325: 499-504.
- Pedraza Santos, M. E., Lopez Peralta, M. C., Gozalez Hernandez, V. A., Engleman Clark, M. E. and Sacher Garcia, P. 2005. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84: 189-198.
- Nhut, D. T., Don, N. T., Vu, N. H., Thien, N. Q., Thuy, D. T. T., Duy, N. and Teixeira da Silva, J. A. 2006. Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology. In: Teixeira da Silva J (ed) Advance Technology in Micropropagation of some Important Plants, 2nd edn. Global Science Books, UK, 325-35.
- Reed B. M., Buckley, P. M. and Dewllde, T. N. 1994. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant-Springer*, 31: 53-57.
- Van Zaayen, A., Loebenstein, G., Lawson, R. H. and Brunt, A. A. 1995. *Alstroemeria*. Virus and Virus-like Diseases of Bulbs and Flower Crops, Wiley Publishers, Chichester, UK, pp. 237-249.

## Evaluation of Surface Disinfection Methods of Rhizome Derived Explant in order to Control of Fungal and Bacterial Contaminations in Regeneration of *Alstroemeria* cv. "Balance" under *In Vitro* Conditions

Beigi Harchegani<sup>1</sup>, M., Nazarian<sup>1</sup>, H., Ebrahimi<sup>2</sup>, M. A., Otroshi<sup>3</sup>, M. and Latifikhah<sup>4</sup>, E.

### Abstract

In this study, the effect of different disinfectant substances (70% Ethylic alcohol, sodium hypochlorite, Mercuric chloride, Cetrimide & chlorhexidine, Dettol, Cephalixin, Permanganate, Ridomil, Potassium phosphite) for contamination control in rhizome derived explants of *Alstroemeria* cv. 'Balance', were investigated. After culturing, explants pollution rates for different treatments, was measured daily. These experiments were implemented in a CRD design with 20 treatments and 3 replications. Analysis of variance (ANOVA) was done compared using LSD's test at 0.05 level of probability. It was revealed that disinfection with 70% Ethylic alcohol for one min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 20 min, 500 mg diluted Cephalixin in 400 milliliter sterile distilled water for a-quarter; Et.Cl.Cf (C), was the most effective method in bacterial infection control. The procedure of disinfection with 70% Ethylic alcohol for one min, Dettol 1:40 diluted in sterile distilled water for 30 min, 3% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 10 min; Et.Dt.Cl (R), and disinfection method with 70% Ethylic alcohol for one min, Cetrimide and chlorhexidine 1:10 diluted in sterile distilled water for 30 min, which the rhizomes being rinsed with sterile distilled water, which had been sterilized with 70% Ethylic alcohol for one min, 40% sodium hypochlorite + 1 drop of Tween or dishwashing liquid for 35 min; Et.Cl. (T) revealed the best effect on fungal contamination control. Disinfection with 70% Ethylic alcohol for one min, Cetrimide and chlorhexidine 1:10 diluted in sterile distilled water for 30 min; Et.Cc. (L), was not effective in contaminations control.

**Keywords:** Tissue culture, *Alstroemeriaceae*, Sterilization

---

1 and 2. MSc and Professor, Respectively, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University of Karaj, Karaj, Iran

3. Associate Professor, Department of Tissue Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute, Najaf Abad, Isfahan, Iran

4. Instructor, Departemant of Horticulture, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

※: Corresponding author

Email: maryam.baigi@yahoo.com