The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

Exploring Disinfection Methods for *Iris pseudacorus* L. Rhizome and Seed Under In-Vitro Conditions

Vajihe Abbasi Qadi [1], Esmaeil Chamani[2]✉, Younes Pourbeyrami Hir [3], Mehdi Mohebodini [4], Valiollah Ghasemi Omran [5]

1. Department of Horticultural Sciences, Mohaghegh Ardebili University, Ardebil, Iran. E-mail: vajihe.abbasi@gmail.com
2. Corresponding Author, Horticultural Department, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil. Iran. E-mail: echamani@uma.ac.ir
3. Horticultural Department, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil. Iran. E-mail: Younes_ph62@uma.ac.ir
4. Horticultural Department, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil. Iran. E-mail: mohebodini@uma.ac.ir
5. Genetic and Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: ghasemiomran@yahoo.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 16 February 2023

Received in revised form: 29 August 2023

Accepted: 10 September 2023

Published online: Spring 2024

Keywords:

Heat treatment,

antibiotic,

sterilization,

benomyl,

tissue culture.

ABSTRACT

Iris pseudacorus L. is one of the native and prominent ornamental species in Iran. Its propagation by tissue culture is prone to sever bacterial and fungal contaminations of the explants, particularly in rhizomes., which causes the failure of conventional sterilization methods. In order to optimize the least dangerous method for sterilization of *Iris pseudacorus* rhizome and seed under in vitro culture condition, two separate experiments were performed each in a completely randomized design with five replications. 16 and 15 methods were applied for rhizome and seeds steriliztion, respectively. The treated specimens were cultured in a hormone-free MS medium and two weeks later, various indices such as infection percentage, germination percentage, mean leaf length and mean root length were measured. Then intact specimens were transferred to the MS media containing different concentrations of thidiazuron (TDZ) and naphthalen acetic acid (NAA) for proliferation.

The results showed that A15 treatment (water bath (42 °C) for 60 mins, fluconazole fungicide and antibiotics streptamycin for 60 mins, alcohol 70% for one min. and NaoCl 4% for 10 mins) on rhizome explants with the lowest contamination percentage (11%) and a high germination rate of 88% was the best treatment. Also, A13 treatment with 85% germination and 15% contamination obtained the second place. Seeds-treated with treatment B2 using hot water and 3% sodium hypochlorite and treatment B5 using hydropriming with running water and hypochlorite 2% had the highest germination rate of 71.74% and contamination was almost zero. Meanwhile the highest proliferation was obtained in the culture medium containing MS and a combination of 5 µM TDZ and 6 µM NAA.

Cite this article: Abbasi Ghadi, V., Chamani, I, Pourbirami Hir, Y., Mohebodini, M. & Ghasemi Omaran, V. (2024). Exploring Disinfection Methods for *Iris pseudacorus* L. Rhizome and Seed Under In-Vitro Conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (1), 153-175. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.347451.2055

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.347451.2055

Extended Abstract

Introduction

Iris pseudacorus L. is one of the native and prominent ornamental species in Iran. Its propagation by tissue culture is prone to sever bacterial and fungal contaminations of the explants, particularly in rhizomes., which causes the failure of conventional sterilization methods. In addition, low speed propagation by seed and season-dependent propagation by rhizomes, altogether have reduced florists tendency to use this beautiful flower in

the ornamental plants industry. The present research aimed to optimize the best and least dangerous disinfection method for the *in vitro* cultivation of rhizomes and seeds of this species of *Iris*.

Materials and Methods

This research was conducted as two separate trials based on a completely randomized design with 16 treatments on rhizomes and 15 treatments on seeds, in five replications to overcome the microbial infections under *in vitro* propagation. After disinfecting, the treated explants were cultured in a hormone-free MS medium. Two weeks after cultivation, some parameters, including infection percentage, germination percentage, average leaf length, and average root length, were recorded. After that, healthy samples were cultivated in MS culture medium containing different concentrations of thidiazuron and naphthaleneacetic acid for proliferation.

Results and Discussion

Based on the results, compounds such as sodium hydroxide, warm water, and hydro-priming performed the best for seed sterilization. The highest germination rate (71.74 %) and least infection rate (almost zero) were observed in the seed explants of treatments B2 in which warm water and 3% sodium hypochlorite were applied, and also B5 in which hydro-priming with running water and immersion in 2% sodium hypochlorite were used. The sterilization of the rhizomes is much more difficult than that seeds since underground organs are in contact with a wide range of fungal and bacterial infections. Also *I. pseudacorus* habitats on the margins of marshes, banks of rivers and streams are subjected to wider infections. Based on the findings, sodium hypochlorite does not alone sufficent to control the bacterial and fungal infections of *I. pseudacorus* L. It was found that the rhizome explants treated by A15 exhibited an infection rate of 11 percent and a germination rate of 88 percent. Also, treatment A13 with a germination rate of 85 percent and an infection rate of 15 percent was the second-best treatment. In general, the use of hot water bath at 42°C and 46°C and the use of fungicides benomyl and fluconazole and antibiotics streptomycin, gentamicin, and clindamycin outperformed antibiotics terbinafine and nystatin. Data analysis of sterilized samples showed that the concentration of 5 µM TDZ and 6 µM NAA hormones resulted in the highest amount of proliferation.

Conclusion

The fungicides benomyl and fluconazole along with clotrimazole and antibiotics streptomycin, gentamicin and clindamycin were more effective in controlling intensive fungal and bacterial infections of rhizomes. With the advantage of better effectiveness and greater safety, utilizing hot water bath, along with fungicides and antibiotics can be a more efficient method for providing the required growth conditions for the rhizomes-derived explants of *I. pseudacorus* instead of the use of toxic, dangerous, and harmful compounds.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۵، شماره ۱

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

ارزیابی روش‌های ضدعفونی ریزوم و بذر زنبق مردابی در شرایط درون‌شیشه‌ای

وجیهه عباسی قادی[۱] | اسماعیل چمنی[۲]✉ | یونس پوربیرامی هیر [۳]| مهدی محب الدینی[۴]| ولی اله قاسمی عمران[۵]

۱. گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: vajihe.abbasi@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: echamani@uma.ac.ir

۳. گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: Younes_ph62@uma.ac.ir

۴. گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: mohebodini@uma.ac.ir

۵. پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران. رایانامه: ghasemiomran@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۷
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۹
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:
سترون‌کردن، آنتی‌بیوتیک، بنومیل، تیمارگرمایی، کشت بافت.

چکیده

زنبق مردابی یکی از گونه‌های زینتی بومی و ارزشمند است. اصلی‌ترین مشکل در شروع کشت بافت این گیاه وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی شدید است که باعث شکست روش‌های معمول سترون‌کردن می‌شود. به‌منظور بهینه‌سازی کم‌خطرترین روش ضدعفونی ریزوم و بذر زنبق مردابی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای انجام شد. دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. به ترتیب ۱۶ و ۱۵ نوع روش برای ضدعفونی بذر و ریزوم به‌کار برده شد. ریزنمونه‌های تیمار شده پس از طی مراحل ضدعفونی در محیط‌کشت موراشی اسکوگ بدون هورمون کشت شدند، دو هفته پس از کشت، شاخص‌های مختلف از قبیل درصد آلودگی، درصد جوانه‌زنی، میانگین طول برگ و میانگین طول ریشه اندازه‌گیری شد. پس از این مرحله نمونه‌های سالم در محیط کشت موراشی اسکوگ حاوی غلظت‌های مختلف تیدیازرون و نفتالین استیک اسید جهت پرآوری، کشت شدند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در تیمار پانزدهم (ریزنمونه‌های ریزوم، ۶۰ دقیقه حمام آبگرم و ۶۰ دقیقه قارچ‌کش فلوکونازول و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و یک دقیقه الکل ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۴ درصد)، کمترین درصد آلودگی (۱۱درصد) و بیشترین جوانه‌زنی ۸۸ درصد، برترین تیمار بود. رتبه دوم مربوط به تیمار سیزدهم (۶۰ دقیقه حمام آبگرم دمای ۴۲ درجه+۶۰ دقیقه در قارچ‌کش فلوکونازول+جنتامایسین+کلیندامایسین+یک دقیقه الکل ۷۰درصد+۱۰دقیقه هیپوکلریت سدیم۳درصد) با جوانه‌زنی ۸۵درصد و آلودگی ۱۵درصد بود. در ریزنمونه¬های بذری، تیمار دوم و تیمار پنجم بیشترین میزان جوانه‌زنی (۷۱/۷۴درصد) مشاهده شد. نتایج پرآوری نشان داد که غلظت ۵ میکرومولار تیدیازرون +۶میکرومولار از نفتالین استیک اسید بیشترین میزان پرآوری را به همراه داشت.

استناد: عباسی قادی، وجیهه؛ چمنی، اسماعیل، پوربیرامی هیر، یونس؛ محب الدینی، مهدی و قاسمی عمران، ولی اله (۱۴۰۳). ارزیابی روش‌های ضدعفونی ریزوم و بذر زنبق مردابی در شرایط درون‌شیشه‌ای. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۵ (۱)، ۱۷۵-۱۵۳. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.347451.2055

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.347451.2055

مقدمه

تیره زنبق دارای ۲۶ گونه گیاه بومی ایران است که در این میان ۲۱ گونه مربوط به جنس زنبق و ۵ گونه مربوط به جنس گلایول می‌باشند (Ghahraman, 1978). زنبق‌ها از تک‌لپه‌ای‌های پیازدار و یا ریزوم‌دار هستند. زنبق‌ها گیاهانی چند ساله با کیفیت تزئینی بالا و طیف گسترده‌ای از اشکال و رنگ‌های گل، دوره‌های مختلف گلدهی و مقاومت بالا در برابر عوامل زیستی و غیرزیستی هستند که برای کشت در مناطق مختلف آب و هوایی مورد استفاده طراحان فضای سبز قرار می‌گیرند. در طب سنتی و عامیانه، مردم از برگ، ریشه و حتی ریزوم برای تولید ترکیبات مختلف گیاهی، محصولات دارویی و آرایشی گیاهی استفاده می‌کنند (Tikhomirova, 2017). یکی از خاص‌ترین گونه‌های زنبق بومی شمال ایران، گونه زنبق مردابی[1] می‌باشد. زنبق‌ها در روش‌های سنتی، عموماً به کمک روش رویشی تکثیر می‌شوند. تکثیر گونه‌های زنبق به‌صورت غیرجنسی با شکافتن پیاز یا ریزوم انجام می‌شود.

در طول شش دهه اخیر، دانشمندان موفق به تولید گیاهان زنبق عاری از ویروس شدند. در ادامه این تلاش‌ها باگذشت زمان، چندین دستورالعمل برای کشت درون شیشه‌ای، با القا ریخت زایی در بسیاری از ارقام کاشته شده و بومی، یا گونه‌های زنبق در معرض خطر گزارش شده است. در تک‌لپه‌هایی مانند زنبق، یکی از مهم‌ترین موارد جهت ایجاد پاسخ اندام‌زایی در کشت درون شیشه‌ای، منبع ریز نمونه است (Buckseth *et al*., 2017). اگرچه در شرایط طبیعی، تکثیراز طریق بذر روش متداولی برای تکثیر این گیاه است، اما تولید در مقیاس وسیع و تجاری آن توسط عواملی مانند کند بودن سرعت رشد گیاهچه در تکثیر به روش جنسی (به‌خصوص در حجم زیاد و زمان کم)، دگرگرده‌افشانی، تولید کم بذر، دوره جوانی طولانی دانهال‌ها تا زمان بلوغ و گلدهی و موفقیت جوانه‌زنی کم، کارایی تکثیر جنسی این گیاه را کاهش می‌دهد و منجر به کاهش راندمان تولید می‌شود (Lu *et al*., 2017)، در نتیجه، گیاه زنبق معمولاً در تکثیر تجاری، با استفاده از اندام‌های زیرزمینی مانند ریزوم و پیاز تکثیر می‌شود که متأسفانه نسبت به سایر اندام‌ها از سطح آلودگی بالاتری برخوردار می‌باشند (Kromer, 1985). بنابراین، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مشکلات اصلی استفاده از اندام‌های زیرزمینی به عنوان ریزنمونه است. هنگامی که هدف کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی می‌تواند لطمه‌های جبران‌ناپذیری به آن وارد آورند. به‌طورکلی، حذف آلودگی‌های قارچی و باکتریایی اولین و مهم‌ترین مرحله در ریز ازدیادی تجاری گیاهان به شمار می‌آید و موجب موفقیت در کشت بافت و جلوگیری از زیان‌های اقتصادی می‌گردد (Shahriari *et al*., 2011).

این آلودگی در محیط‌های کشت ممکن است به سرعت ظاهر شوند یا نهان باشند و برای مدت طولانی خاموش باقی بمانند. باکتری‌های اپی‌فیتیک در سطح گیاهان زندگی می‌کنند و از طریق ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی قابل حذف هستند. در مقابل، میکروب‌های اندوفیت، میکروب‌هایی هستند که به‌صورت کلنی در بافت‌های زنده گیاهان وجود دارند، این میکروب ها بدون ایجاد اثر منفی سریع، خفته باقی می‌مانند و به‌راحتی با روش‌های ساده ضدعفونی سطحی از بین نمی‌روند. آلودگی‌های درونی با استفاده از آنتی‌بیوتیک یا قارچ‌کش‌ها کنترل می‌شوند. بنابراین، درمان آنتی‌بیوتیکی برای حل این مشکل اهمیت زیادی پیدا می‌کند. امروزه، چندین روش جایگزین جدید از طریق نور، گرما، دود، امواج مایکروویو و تیمار آب‌گرم نیز برای کنترل آلودگی‌ها وجود دارد که توسط چندین پژوهشگر گزارش شده است. اما اکثر محققان همچنان برای کنترل آلودگی‌ها در طی کشت درون شیشه‌ای و آزمایشگاهی گیاه، به مواد شیمیایی مانند هیپوکلریت سدیم و الکل وابسته‌اند (Sinha Ray & ali., 2016). استفاده از نانوذرات نیز در چندین گزارش سترون‌سازی بیان شده است اما پژوهشگران بیان کردند که اثربخشی نانوذرات در حذف آلاینده‌های میکروبی در کشت بافت گیاهی به ابعاد، اندازه، توزیع و نوع آنها بستگی دارد. همچنین، چندین

1*Iris pseudacorus* L.
2Morphogenesis
3Organogenesis

محقق اثرات نامطلوب نانوذرات را بر بقا و بازسازی بعدی ریزنمونه‌ها در حین استفاده از نانوذرات سمی گزارش کرده‌اند (Sivanesan *et al.*, 2021).

غلبه بر آلودگی‌های داخلی بسیار دشوار است زیرا سترون‌کردن فقط به سطح ریز نمونه‌ها محدود می‌شود. در ریز نمونه‌های گیاهی که حاوی آلودگی‌های داخلی هستند، آنتی‌بیوتیک‌های سیستمیک یا قارچ‌کش باید استفاده شود (Mbah & Wakil, 2012, Teixeira da Silva *et al*., 2015, Oo *et al*., 2018, Patel *et al*., 2018). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یکی از موادی که به محیط کشت اضافه می‌شود روشی بسیار مؤثر و کم‌خطر است. اما افزودن آنتی‌بیوتیک در محیط ممکن است منجر به سمیت گیاه شود. در انتخاب آنتی‌بیوتیک‌ها، نوع آنتی‌بیوتیک‌ها از گیاهی به گیاه دیگر متفاوت است، در نتیجه ازبین‌بردن آلودگی نهفته در کشت ممکن است با استفاده از چندین آنتی‌بیوتیک انجام شود. به همین دلیل لازم است از حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک با اثر مهارکنندگی در برابر رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های خاص استفاده شود. برای این منظور امروزه از روش‌های شناسایی مناسب مولکولی مانند توالی حفاظت شده s۱۶ در rDNA باکتری‌ها و توالی فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) برای شناسایی قارچ‌ها استفاده می‌شود. سپس با شناسایی دقیق نوع باکتری و قارچ، از آنتی‌بیوتیک و قارچ‌کش مناسب برای ریشه‌کنی آنها استفاده شود. (Young *et al*., 1984 ., Fisse *et al*., 1987., Leifert *et al*., 1992). بنابراین، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها با سمیت گیاهی کم، برای ازبین‌بردن آلودگی‌های درونی مطلوب است و برای از بین بردن آلودگی نهفته، کنترل میکروبیولوژیک ریزنمونه‌های انتخاب شده و تعیین آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌های جدا شده باید انجام شود (Tikhomirova, 2020).

تا کنون مطالعات کمی مربوط به حذف آلودگی از گیاه زنبق انجام شده است، ازاین‌رو، انجام مطالعات در مورد ضدعفونی بافت‌ها و اندام‌های زیرزمینی گیاهان زینتی، مانند زنبق مردابی، بسیار مهم و ارزشمند است. این پژوهش باهدف حذف آلودگی کامل از ریزوم و بذر گیاه زینتی ارزشمند و بومی زنبق مردابی، با کارآمدترین و کم‌خطرترین روش، انجام شده است. در ادامه جهت ازدیاد و پرآوری گیاه از تیمار غلظت‌های مختلف تیدیازرون و نفتالین استیک اسید استفاده و تاثیر غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

پیشینه پژوهش

غلظت و مدت‌زمان قرارگرفتن در معرض عوامل ضدعفونی‌کننده برای قسمت‌های مختلف گیاه و نوع گیاه متفاوت است (Srivastava *et al.*, 2010). غوطه ورشدن ریز نمونه‌های جوانه‌های جانبی انار در رقم 'بهاگاوا'[1] در محلول آنتی‌بیوتیک به طور مؤثری منجر به رشد موفق ریز نمونه‌ها می‌گردد (Patel *et al*., 2018). ضد عفونی ریزنمونه‌های ریزوم و نوک شاخساره گیاه موز برای کشت درون شیشه‌ای توسط آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، آلودگی باکتریایی درونی را حذف کرده، بهترین نتیجه با تیمار ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در مدت یک ساعت و چهل دقیقه گزارش گردید (Habiba *et al.*, 2002). ترکیب آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با تیامین و جنتامایسین در محیط کشت، مانع از رشد باکتری‌های داخلی ریزنمونه‌های مرکبات و دیگر درختان مثمر شده است (Reed & Abdelnour-Esuivel, 1991). همچنین در پژوهشی محققین جهت رفع آلودگی جوانه‌های ریزوم گیاه زنجبیل، از چهار عامل استریل کننده شامل قارچ‌کش، باکتری‌کش، آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و هیپوکلریت سدیم برای سترون‌کردن با غلظت‌ها و مدت‌زمان‌های مختلف مورد آزمایش قرار دادند. قرارگرفتن در معرض عوامل ضدعفونی‌کننده نشان داد که غلظت۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بنومیل همراه با هیپوکلریت سدیم آلودگی ریز نمونه‌ها را کاهش داده است (Mol *et al.*, 2016). همچنین، در بررسی دیگر برای کنترل آلودگی ریز نمونه‌های ریزوم گیاه آلسترومریا در شرایط درون شیشه‌ای، تیمار ریز نمونه‌ها با استفاده از بالاترین

1'Bhagva'

غلظت آنتی‌بیوتیک در محیط کشت به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین کمترین میزان آلودگی را در پی داشت (Shahriari *et al.*, 2011). همچنین، تیمار ریزنمونه‌های جوانه ریزوم سترون‌شده در آنتی بیوتیک‌ها برای مدت طولانی، یعنی ۵ روز پس از پیش تیمار با قارچ کش‌ها و پس از آن تیمار با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (وزنی/حجمی) درصدمیزان آلودگی در شرایط آزمایشگاهی را از ۹۰ درصد به ۱۰ درصد کاهش داد (Kritzinger *et al.*, 1998). روش‌های دیگری مانند پیش تیمار با قارچ‌کش‌ها و سپس هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر گل شیپوری استفاده شد (Chang *et al.*, 2003). با این حال، آلودگی آزمایشگاهی و میزان زنده‌مانی در این پژوهش‌ها ذکر نشده است. پژوهشگران کارایی ضدعفونی در انواع مختلف ریز نمونه گونه‌ای زنبق را مقایسه کردند. در ریزوم‌ها،[۲]درصد آلودگی ۸۶ درصد گزارش شد، اما برای ریز نمونه‌های برگ تنها ۲۰ درصد گزارش شد (Marinescu *et al.*, 2013). استفاده از یک تا پنج میکرومولار تیدیازرون یا یک تا ۲۰ میکرومولار زآتین باززایی ساقه جدید از ریزنمونه‌های برگ را در ۵ رقم بلوبری بهبود بخشید (Cao *et al.*, 2002; Cao & Hammerschlag, 2000). همچنین ۱۰میکرومولار تیدیازرون و ۱ میکرومولار نفتالین استیک اسید مناسب‌ترین ترکیب در باززایی نوساقه در کرن‌بری می‌باشد (Marčotrigiano *et al.*, 1996). در پژوهشی دیگر روی گونه‌ای زنبق بیشترین میزان بقای جنین‌های[۴]نابالغ (۵۸ درصد) در محیط MS حاوی۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و بالاترین تعداد شاخه در هر ریزنمونه در محیط موراشی اسکوگ حاوی ۲میلی گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین+ ۲ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید حاصل شد (Doğan & Caglar, 2018).

روش‌شناسی پژوهش

آماده‌سازی مواد گیاهی و تهیه منبع ریز نمونه

در این پژوهش ریز نمونه‌های ریزوم گیاه زنبق مردابی در بهار سال ۱۳۹۷ از رویشگاه طبیعی آنها در استان مازندران، شهرستان ساری در موقعیت جغرافیایی "۱۵ '۳۴ °۳۶ شمالی و" ۳۹ '۰۰ °۵۳ شرقی جمع‌آوری شدند. گیاهان در داخل جعبه‌های یونولیت محتوی پرلیت و قارچ‌کش بنومیل به غلظت ۲ گرم در لیتر به آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی منتقل شدند. پس از انتقال در شرایط کنترل شده و دمای خنک ۲ ±۱۶ درجه سلسیوس و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. در طول مدت نگه‌داری از ریزوم‌ها، تعویض بستر هر هفته با قارچ‌کش و آب دیونیزه انجام شد. ازآنجایی‌که شرایط آلودگی در محیط رشد طبیعی گیاه زنبق مردابی بسیار شدید است و از طرفی کیفیت ریز نمونه اولیه در موفقیت کشت بافت آن بسیار مؤثر است، ریزوم‌ها تحت شرایط گفته شده به مدت یک ماه نگهداری و پس از آن، جهت تهیه ریز نمونه و کشت بافت از آنها استفاده شد (شکل ۱).

نمونه‌برداری از بذر نیز در شهریورماه سال ۱۳۹۷، با برداشت کپسول‌های بذر و انتقال آنها به آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. به علت گرمای شدید در اواخر تابستان کپسول‌ها بعد از برداشت و هوادهی مکرر در سایه باز شدند و جداسازی بذر از آنها انجام شد. بذور در دمای اتاق تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

1*Zantedeschia aethiopica*
2*Iris aphylla* L.
3Cranberry
4*Iris kirkwoodie*

شکل ۱. الف: گیاه زنبق مردابی در رویشگاه اصلی در فصل گلدهی. ب: انتقال نمونه‌های جمع‌آوری‌شده ریزوم به آزمایشگاه
ج: خارج کردن نمونه‌ها از محلول آب+ پرلیت و قارچ‌کش جهت انجام مراحل ضدعفونی (منبع: نگارندگان)

تیمارهای مختلف ضدعفونی ریزوم و بذر

برای انجام این پژوهش دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملا تصادفی در نظر گرفته شد. در آزمایش اول ۱۶نوع تیمار بر روی ریزوم و در آزمایش دوم ۱۵نوع تیمار روی بذر انجام شد. برای هر دو آزمایش تعداد تکرار ۵ عدد در نظر گرفته شد و هر واحد آزمایشی شامل یک ظرف شیشه‌ای درب‌دار به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر انتخاب و در هر ظرف یک نمونه پس از انجام عملیات سترون‌کردن در محیط‌کشت موراشی اسکوگ (MS) بدون هورمون کشت شد. ریزوم‌ها پس از شستشو اولیه با مایع ظرفشویی کاملا از گل و لای پاک شد. سپس جداسازی پوست رویی با تیغ اسکالپل انجام شد و پس از آن به مدت یک ساعت در زیر جریان آب جاری قرار داده شد و در ادامه مراحل ضدعفونی اعمال گردید. در طی روند انجام این پژوهش، از مواد و روش‌های مختلفی جهت سترون‌کردن ریزوم‌ها و بذرها استفاده گردید. جهت ضدعفونی‌کردن ریزوم از هیپوکلریت سدیم، حمام آب گرم، کلرید جیوه، نانوذرات نیترات نقره، قارچ‌کش بنومیل، و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کلیندامایسین، جنتامایسین، تربنافین، نیستاتین و استرپتومایسین و قارچ‌کش‌های بنومیل، فلوکونازول و کلوتریمازول در آزمایش‌های جداگانه استفاده شد. غلظت و مدت زمان استفاده از این تیمارها همراه با نام اختصاری در نظر گرفته شده برای هر تیمار در جدول ۱ شرح داده شده است. انتخاب غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس پژوهش‌های گذشته محققان و همچنین پیش‌آزمون‌های اولیه انجام شد. جهت ضدعفونی بذر نیز از مواد و روش‌های مختلفی استفاده شد که عبارت بودند از: استفاده از حمام آب گرم، هیپوکلریت سدیم، روش هیدروپرایمینگ و محلول سود که شرح کامل آن در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱. انواع تیمارهای اعمال شده جهت سترون‌کردن ریز نمونه‌های ریزوم گیاه زنبق مردابی

نام اختصاری تیمار	نوع آزمایش	تیمارهای ضدعفونی اعمال شده
A1	هیپوکلریت سدیم	یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۳ درصد
A2		یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۴۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۳ درصد
A3		یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد
A4		یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۴۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد
A5	قارچ‌کش و هیپوکلریت سدیم	۴۰ دقیقه قارچ‌کش بنومیل به غلظت ۱/۵گرم در لیتر+ یک دقیقه الکل ۶۰ درصد +۲۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۳ درصد
A6	حمام آب گرم	۶۰ دقیقه حمام آب گرم + یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد
A7	حمام آب گرم و قارچ‌کش	۶۰ دقیقه قراردادن در بنومیل به غلظت ۴ گرم در لیتر+ ۶۰ دقیقه حمام آب گرم + یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد
A8	کلرید جیوه	یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۲۵ دقیقه کلرید جیوه ۳ درصد + ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد
A9		یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد + اضافه‌کردن کلرید جیوه به غلظت‌های ۵۰،۱۰۰،۱۵۰،۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت
A10	کلرید نقره	۲۴ ساعت قراردادن در کلرید نقره ۳ درصد +یک دقیقه الکل ۷۰ درصد +۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد
A11	پرکلرین	۲۵ دقیقه پرکلرین به غلظت ۱۵۰ میلی‌لیتر در لیتر+ ۵۰ دقیقه بنومیل به غلظت۱/۵ گرم در لیتر
A12	نیترات نقره	۱۰ دقیقه قراردادن در نیترات نقره به غلظت ۱۰ ماکرومولار (در یک لیتر آب دیونیزه) +یک دقیقه الکل ۷۰ درصد +۱۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۳ درصد
A13	حمام بن ماری و آنتی‌بیوتیک و قارچ‌کش	۶۰ دقیقه حمام آبگرم با دمای ۴۲ درجه سلسیوس+ ۶۰ دقیقه قراردادن در قارچ‌کش فلوکونازول (۰/۴۵گرم)+ ۲ میلی‌لیتر جنتامایسین در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه)+ کلیندامایسین(۲/ ۱گرم) +یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۳ درصد
A14		۶۰ دقیقه حمام آبگرم با دمای ۴۲ درجه سلسیوس+ آنتی‌بیوتیک تربنافین (۱/۵گرم)+ محلول کلوتریمازول (۶ میلی‌لیتر در۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه) +یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۴ درصد
A15		۶۰ دقیقه حمام آبگرم با دمای ۴۶ درجه سلسیوس+ ۶۰ دقیقه هم‌زدن در ۲/۱۵ گرم قارچ‌کش فلوکونازول+ ۰/۳۴گرم آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین+ یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۴ درصد
A16		۴۰ دقیقه حمام آبگرم با دمای ۴۶ درجه سلسیوس+ ۶۰ دقیقه قارچ‌کش فلوکونازول (۰/۹گرم)+ نیستاتین (یک گرم)+ یک دقیقه الکل ۷۰ درصد + ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۴ درصد

جدول ۲. تیمارهای اعمال شده جهت سترون‌کردن ریز نمونه‌های بذر گیاه زنبق مردابی

نام اختصاری تیمار	نوع آزمایش	تیمارهای ضدعفونی اعمال شده
B1	حمام آب گرم+هیپوکلریت سدیم	حمام آب گرم ۴۵ درجه سلسیوس + هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B2		حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس + هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B3		حمام آب گرم ۸۵ درجه سلسیوس + هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B4	هیدرو پرایمینگ+ هیپوکلریت سدیم	شستشو با آب جاری به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B5		شستشو با آب جاری به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B6		شستشو با آب جاری به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B7	سود + هیپوکلریت سدیم	قراردادن در محلول سود ۵ درصد به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B8		قراردادن در محلول سود ۵ درصد به مدت ۶ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B9		قراردادن در محلول سود ۵ درصد به مدت ۱۰ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B10		قراردادن در محلول سود ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B11		قراردادن در محلول سود ۱۰درصد به مدت ۶ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B12		قراردادن در محلول سود ۱۰درصد به مدت ۱۰ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B13		قراردادن در محلول سود ۱۵درصد به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B14		قراردادن در محلول سود ۱۵درصد به مدت ۶ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه
B15		قراردادن در محلول سود ۱۵درصد به مدت ۱۰ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه

شکل ۲. الف: قراردادن بذرهای گیاه زنبق مردابی درون محلول سود ۵درصد- ب و ج: قراردادن ریزوم‌های گیاه زنبق مردابی درون حمام آب گرم (منبع: نگارندگان).

ریز نمونه‌های ریزوم پس از انجام تیمار و سه مرحله شستشو، از محل‌های دارای جوانه برش داده شده و درون شیشه‌های دربسته حاوی محیط موراشی اسکوگ پایه بدون هورمون قرار داده شدند، سپس به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۲ درجه سلسیوس و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند تا ریز نمونه‌ها در محیط کشت، رشد اولیه را انجام دهند. ریزنمونه‌های بذری نیز پس از اعمال تیمار درون محیط کشت موراشی اسکوگ با ۷ گرم آگار (pH=۸/۵) کشت شدند. دوهفته پس از کشت درون شیشه‌ای ریز نمونه‌های ریزوم و بذر ، شاخص‌های مختلف از قبیل درصد آلودگی، درصد جوانه‌زنی، میانگین طول برگ، میانگین طول ریشه، به کمک کولیس دیجیتال اندازه‌گیری و میانگین تعداد برگ و میانگین تعداد ریشه شمارش و ثبت شد. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین داده‌ها نیز به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

پرآوری گیاه زنبق مردابی

جهت بررسی بهترین تیمار پرآوری، پس از سترون‌سازی ریزنمونه‌ها، از محیط کشت موراشی اسکوگ به همراه هورمون‌های تیدیازرون در سه غلظت (۰، ۲/۵ و ۵ میکرومولار) و نفتالین استیک اسید در سه غلظت (۰و ۳ و ۶ میکرومولار) استفاده شد. آزمایش بصورت طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد و شاخص‌های درصد زنده‌مانی، تعداد گیاهچه، تعداد ریشه، طول برگ و طول ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش

تیمارهای ضدعفونی اعمال شده بر ریزوم گیاه زنبق مردابی

به علت وجود آلودگی بسیار شدید در ریزوم گیاه زنبق مردابی، با توجه به محیط رشد این گیاه در حاشیه رودها، نهرها، دریاچه‌ها و مرداب‌ها، تیمارهای متعددی جهت حذف آلودگی از ریزوم اجرا شد. در اولین آزمایش، غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم (در تیمارهای A1-A4) استفاده شد، نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با کاربرد هیپوکلریت سدیم در غلظت‌های ۳ و ۵ درصد در زمان‌های مختلف (۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه)، درصد آلودگی در ریز نمونه‌ها بسیار بالابود (۹۰/۶۳درصد) و در نتیجه درصد جوانه‌زنی نیز در این تیمارها صفر بود. این امر نشان‌دهنده عدم توانایی هیپوکلریت سدیم به‌تنهایی در کنترل آلودگی‌های میکروبی ریزوم گیاه زنبق مردابی است.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف سترون‌کردن ریزوم بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گیاه زنبق مردابی

		میانگین مربعات					
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد آلودگی	درصد جوانه‌زنی	طول برگ	طول ریشه	تعداد برگ	تعداد ریشه
تیمار	۱۵	۳۵/۵۰**	۷۷/۱۱**	۳/۷۹**	۴/۶۲**	۴/۰۲**	۴/۶۷**
خطا	۶۴	۰/۰	۰/۰	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۶
ضریب تغییرات (درصد)	-	۷/۲۸	۳/۵۸	۱۴/۳	۱۴/۳۳	۱۷/۵۸	۱۸/۰۴

*و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف سترون‌کردن ریزوم بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گیاه زنبق مردابی

تیمار	درصد آلودگی	درصد جوانه‌زنی	طول برگ(سانتی‌متر)	طول ریشه(سانتی‌متر)	تعداد برگ	تعداد ریشه
A1	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A2	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A3	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A4	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A5	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A6	۶۲/۲۵^{b}	۲۵/۲۰^{f}	۰/۵۹^{d}	۰/۵۵^{e}	۱/۲۱^{b}	۱/۱۹^{c}
A7	۱۶/۱۶^{e}	۷۱/۷۴^{c}	۲/۱۹^{c}	۱/۹۰^{d}	۴/۶۲^{a}	۴/۹۷^{ba}
A8	۹۰.۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A9	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A10	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A11	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A12	۹۰/۶۳^{a}	۰/۰۴^{g}	۰/۰۴^{e}	۰/۰^{f}	۰/۰^{c}	۰/۰^{d}
A13	۱۶/۱۶^{f}	۷۶/۳۹^{b}	۴/۴۱^{b}	۵/۱۵^{b}	۴/۶۷ ^{a}	۵/۹۰^{a}
A14	۱۸/۸۴^{d}	۶۷/۹۰^{d}	۲/۶۶^{c}	۴/۰۰^{c}	۴/۲۸^{a}	۴/۶۲^{ba}
A15	۸/۳۵^{g}	۷۹/۲۱^{a}	۸/۰۷^{a}	۹/۰۰^{a}	۳/۶۹^{a}	۴/۱۶^{b}
A16	۲۵/۲۰^{c}	۶۲/۲۵^{e}	۲/۸۹^{c}	۴/۱۶^{bc}	۴/۸۰^{a}	۵/۶۲^{ab}

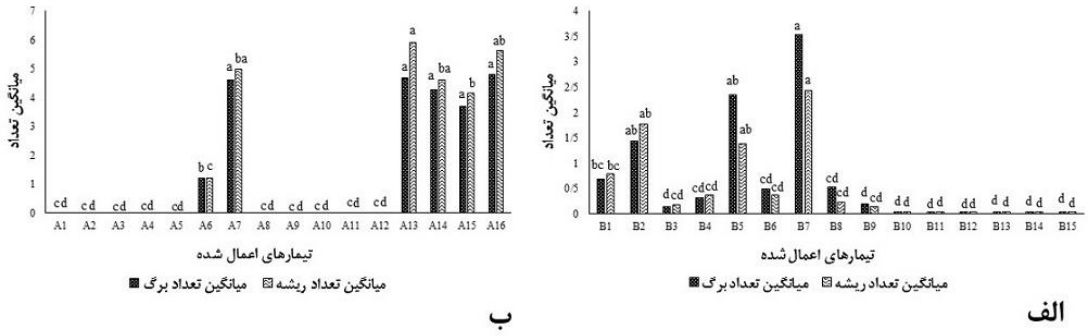
مقادیر ستون های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی دار می باشند.

در تیمارA6 از حمام آب گرم و هیپوکلریت سدیم با غلظت بالا (۵ درصد) و الکل ۷۰ درصد استفاده شد. مدت زمان استفاده از حمام آب گرم یک ساعت بود و درصد آلودگی تا حدی کاهش پیدا کرد و به میزان ۶۲/۲۵ درصد رسید، میزان جوانه‌زنی نیز به ۲۵/۲۰ درصد افزایش یافت. این امر نشان‌دهنده موفقیت اولیه‌ای در کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی بود، در نتیجه در تیمارهای بعدی از این روش بسیار ساده، باارزش و کم‌خطر در کنار سایر روش‌ها استفاده شد. تیمار A7 شامل استفاده از حمام آب گرم و قارچ‌کش سیستمیک بنومیل بود. نتایج حاصل از مقایسه میانگین این تیمار نشان داد که میزان آلودگی به میزان زیادی کنترل شد (۱۶/۱۶ درصد) و متعاقباً میزان جوانه‌زنی به ۷۱/۷۴ درصد افزایش پیدا کرد.

شکل ۳. الف: آلودگی قارچی. ب: آلودگی باکتریایی در اطراف ریز نمونه. ج و د: موفقیت تیمار A15 و A13 در کنترل آلودگی‌های باکتریایی و قارچی (منبع: یافته‌های تحقیق).

در دو تیمار A8 و A9 از کلرید جیوه در غلظت‌های مختلف و به روش‌های مختلف استفاده شد؛ اما نتایج در هر دو تیمار رضایت‌بخش نبود، به‌طوری‌که درصد آلودگی (۹۰/۶۳ درصد) بالا بود و جوانه‌زنی نیز اتفاق نیفتاد. در تیمار A10 از کلرید نقره ۳ درصد استفاده شد ولی همچنان درصد بالایی از آلودگی (۹۰/۶۳ درصد) در محیط درون شیشه‌ای مشاهده شد، همچنین جوانه زنی نیز رخ نداد و این تیمار نیز در کنترل آلودگی ریزوم مفید نبود. در تیمار A11 از هیپوکلریت کلسیم به‌جای هیپوکلریت سدیم استفاده شد که بر اساس یافته‌های علمی پژوهشگران دارای اثر ضدعفونی‌کنندگی است، اما نتایج استفاده از این تیمار نیز موفقیت‌آمیز نبود. در تیمار A12 از نیترات نقره استفاده شد که نتایج مانند تیمار قبلی با آلودگی ۹۰/۶۳ درصد روبرو شد. باتوجه‌به گزارش های ثبت شده در ارتباط با تأثیر مثبت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و قارچ‌کش‌های انسانی در کنترل آلودگی‌های گیاهی، و همچنین موفقیت روش تیمار دمایی، از این ترکیبات و تیمار دمایی در چهار تیمار بعدی A13-A16 استفاده شد. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان دهنده تأثیر مثبت استفاده از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۲ میلی‌لیتردر ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه) در تیمار A13 و کاهش محسوس در میزان آلودگی (۱۶/۱۶ درصد) و به‌تبع آن افزایش میزان جوانه‌زنی ریزوم بود که بیانگر موفقیت این تیمار در از بین بردن آلودگی باکتریایی از ریزنمونه گیاه زنبق مردابی بود.

مقایسه بین تأثیر تیمارها روی درصد آلودگی و درصد جوانه زنی ریزوم ها نشان داد که در تیمارA1، آلودگی به میزان کمی کاهش پیدا کرد و مقدار آن ۹۰/۶۳درصد بود، درصد جوانه‌زنی نیز تقریباً صفر بود. اما در تیمار A14 درصد آلودگی بسیار کاهش پیدا کرد و به ۱۸/۸۴ درصد رسید و میزان جوانه‌زنی به ۶۷/۹۰ درصد افزایش یافت. تیمار A15 بهترین تیمار بین ۱۶ تیمار اعمال شده بر روی ریزوم گیاه زنبق مردابی از لحاظ کاهش میزان آلودگی قارچی و باکتریایی بود، به‌نحوی‌که با به‌کاربردن ۶۰ دقیقه حمام آبگرم با دمای ۴۶ درجه سلسیوس+ ۶۰ دقیقه هم زدن در ۲/۱۵ گرم قارچ‌کش فلوکونازول ۱۵۰ میلی‌گرم + ۰/۳۴گرم آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین+ یک دقیقه الکل ۷۰درصد+ ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۴درصد، میزان آلودگی ۸/۳۵ درصد و در مقایسه با سایر تیمارها به کمترین مقدار رسید. میزان جوانه‌زنی در این تیمار ۷۹/۲۱ درصد بود که در مقایسه با میانگین میزان جوانه‌زنی، این تیمار موفق‌ترین تیمار در میزان جوانه‌زنی نیز بوده است. تیمار A16 نیز اثر کنترل‌کنندگی خوبی بر آلودگی‌ها داشت، به‌طوریکه در این تیمار میزان آلودگی ۲۵/۲۰درصد و درصد موفقیت جوانه‌زنی ۶۲/۲۵ درصد به‌دست آمد که نتیجه نسبتاً خوبی به همراه داشت(جدول ۴).



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر تیمارهای سترون کردن بر تعداد ریشه و برگ در دانهال‌های بذر (الف) و ریزوم (ب)(منبع: یافته های تحقیق).

نتایج مقایسه میانگین شاخص طول برگ نشان داد که بالاترین میانگین رشد طولی برگ مربوط به تیمار A15 و برابر با ۸/۰۷ سانتی‌متر است، پس از آن تیمار A13 با میانگین طول برگ ۴/۴۱ سانتی‌متر در رتبه دوم قرار گرفت. کمترین میانگین طول برگ نیز مربوط به تیمار A6 با میانگین طول برگ، ۰/۵۹ سانتی‌متر بود که در پایین‌ترین رتبه قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین مربوط به شاخص میانگین طول ریشه نشان داد که بیشترین طول ریشه مربوط به موفق‌ترین تیمار یعنی تیمار A15 با میانگین طول ریشه ۹ سانتی‌متر بود(شکل ۴). پس از آن تیمارA13 با میانگین ۵/۱۵ سانتی‌متر در رتبه دوم قرار گرفت.

کمترین مقدار طول ریشه نیز مربوط به تیمار A6 با میانگین طول ریشه ۰/۵۵ سانتی‌متر بود. در مورد شاخص میانگین تعداد برگ در تیمارهای اعمال شده بر روی ریزوم، بیشترین تعداد برگ را تیمار A16 با میانگین ۴/۸ عدد به خود اختصاص داد، اما تیمارهای موفق دیگر یعنی تیمارهای A7، A14، A13، A15 و A16 نیز تقریباً به همین تعداد برگ تولید کردند. کمترین میانگین تعداد برگ مربوط به تیمار A6 با میانگین ۱/۲۱ عدد بود. نتایج مقایسه میانگین، شاخص تعداد ریشه نشان دهنده بیشترین تعداد ریشه در تیمار A13 با میانگین ۵/۹ عدد و کمترین تعداد در تیمار A6 با ۱/۱۹ عدد ریشه بود (شکل ۶).

تیمارهای اعمال شده بر بذر گیاه زنبق مردابی

به‌منظور حذف آلودگی و جوانه‌زنی بذور گیاه زنبق مردابی ۱۵ تیمار در نظر گرفته شد. اثر تیمارهای ضدعفونی بذرها در تمام شاخص‌ها شامل درصد آلودگی، درصد جوانه‌زنی، میانگین طول برگ، میانگین طول ریشه، میانگین تعداد برگ و میانگین تعداد ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین اثر تیمارهای اعمال شده بر صفات ارزیابی شده گیاه زنبق مردابی (جدول ۶) نشان داد که بیشترین میزان آلودگی (۳۴/۴ درصد) در تیمار B4 ایجاد شده است که در آن بذرها به مدت دو ساعت در آب جاری قرار گرفتند و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت ۲ درصد غوطه‌ور شدند، درحالی‌که کمترین آن در تیمارهای B2، B3، B5، B6، B8، B9، B10، B11، B12،B13 ، B14 و B15 مشاهده شد.

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس تیمارهای سترون کردن بذر بر شاخص های رشد و میزان آلودگی در گیاه زنبق مردابی

		میانگین مربعات					
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد آلودگی	درصد جوانه‌زنی	طول برگ	طول ریشه	تعداد برگ	تعداد ریشه
تیمار	۱۴	۱۷/۶۴**	۶۲/۳۹**	۱/۴**	۱/۰۵**	۱/۲۷**	۱/۰۴**
خطا	۶۰	۰/۰	۰/۰	۰/۲	۰/۱۸	۰/۱۷	۰/۱۶
ضریب تغییرات (درصد)	-	۲/۷۳	۱/۹	۳۹/۴۷	۳۹/۲۶	۳۷/۵۸	۳۷/۱۹

** نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد. (منبع: یافته های تحقیق)

بیشترین میزان جوانه‌زنی بذرمربوط به تیمارهای B2، B5 و B7 بود که در تمام این سه تیمار بالاترین درصد جوانه‌زنی بذور یعنی ۷۱/۷۴ درصد مشاهده شد. در تیمار B2 از حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس به همراه هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد.

نتایج مقایسه میانگین شاخص میانگین طول برگ در تیمارهای بذری نشان داد که کمترین طول برگ در تیمارهایی که موفق به جوانه‌زنی و تولید برگ و ریشه شدند مربوط به تیمارB3 و B4 بود که به ترتیب میانگین طول برگ در آنها ۰/۱۵سانتی‌متر و ۰/۳۱ سانتی‌متر بود. بالاترین طول برگ در تیمار B7 با میانگین ۳/۵۳ سانتی‌متر مشاهده شد و پس از آن تیمار B5 با میانگین طول ۲/۴۳ سانتی‌متر در رتبه دوم قرار گرفت (شکل ۴). بررسی تیمارهای مختلف در مورد شاخص میانگین طول ریشه نشان داد که کمترین طول ریشه (۰/۱۲ سانتی‌متر) مربوط به تیمار B3 بود و بیشترین آن ۲/۴۰ و ۲/۰۴ سانتی‌متر به ترتیب مربوط به تیمارهای موفق B5 و B7 بود. همچنین، بررسی شاخص تعداد برگ نشان داد که بالاترین تعداد برگ و ریشه در تیمار B7 ایجاد شد درحالی‌که کمترین تعداد برگ در تیمار B3 (۰/۱۵عدد) و کمترین تعداد ریشه در تیمار B9 با میانگین ۰/۱۴ عدد مشاهده شد. (شکل ۶).

جدول ۶. مقایسه میانگین اثر تیمارهای سترون کردن بذر بر شاخص های رشد و میزان آلودگی در گیاه زنبق مردابی.

تیمارها	درصد آلودگی	درصد جوانه‌زنی	طول برگ (سانتی‌متر)	طول ریشه (سانتی‌متر)	تعداد برگ	تعداد ریشه
B1	۱۶/۱۶^{b}	۵۲/۸۵^{b}	۰/۶۹^{cd}	۰/۵۲^{bc}	۰/۶۹^{bc}	۰/۷۹^{bc}
B2	۰/۰۴^{c}	۷۱/۷۴^{a}	۱/۴۴^{bc}	۱/۲۱^{ab}	۱/۴۴^{ab}	۱/۷۷^{ab}
B3	۰/۰۴^{c}	۶/۱۶^{d} ۱	۰/۱۵^{d}	۰/۱۲ ^{c}	۰/۱۵^{d}	۰/۱۸^{cd}
B4	۳۴/۳۴^{a}	۳۴/۳۴^{c}	۰/۳۱^{d}	۰/۲۷^{bc}	۰/۳۱^{cd}	۰/۳۷^{cd}
B5	۰/۰۴^{c}	۷۱/۷۴^{a}	۲/۴۳^{ab}	۲/۴۰ ^{a}	۲/۳۴^{ab}	۱/۳۹^{ab}
B6	۰/۰۴^{c}	۵۲/۸۵^{b}	۰/۵۰^{cd}	۰/۴۸^{bc}	۰/۵۰^{cd}	۰/۳۷^{cd}
B7	۱۶/۱۶^{b}	۷۱/۷۴^{a}	۳/۵۳^{a}	۲/۰۴^{a}	۳/۵۳^{a}	۲/۴۳^{a}
B8	۰/۰۴^{c}	۳۴/۳۴^{c}	۰/۵۳^{cd}	۰/۵۳^{bc}	۰/۵۳^{cd}	۰/۲۳^{cd}
B9	۰/۰۴^{c}	۶/۱۶^{d} ۱	۰/۱۹^{d}	۰/۱۸^{c}	۰/۱۹^{d}	۰/۱۴^{cd}
B10	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{e}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{d}
B11	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{e}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{d}
B12	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{e}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{d}
B13	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{e}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{d}
B14	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{e}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{d}
B15	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{e}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{c}	۰/۰۴^{d}	۰/۰۴^{d}

مقادیر ستون های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی دار می باشند. (منبع: یافته های تحقیق)

تیمارهای پرآوری

نمونه‌های موفق سترون حاصل از تیمارهای ضدعفونی پس از گذشت دوماه از محیط کشت پایه MS به محیط کشت MS تغییر یافته با تیمارهای مختلف هورمونی جهت پرآوری انتقال داده شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای پرآوری گیاه زنبق مردابی در شرایط درون شیشه‌ای در مورد تمامی شاخص‌های بررسی شده شامل درصد زنده‌مانی، تعداد گیاهچه، تعداد ریشه، میانگین طول برگ و میانگین طول ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول۷). به عبارتی دیگر نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای پرآوری بود. مشاهده‌ها نشان داد روند رشد گیاه زنبق مردابی در فرآیند پرآوری ابتدا تولید شاخه و سپس تولید ریشه است. به علت قابلیت بالای این گیاه، نمونه‌های انتقال داده شده از محیط‌کشت پایه MS به محیط‌کشت پرآوری ، در محیط پرآوری و پیش از قرارگیری در محیط ریشه‌زایی، علاوه بر گیاهچه جدید، ریشه نیز تولید کردند.

جدول ۷. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای پرآوری بر شاخص های رشد در گیاه زنبق مردابی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		درصد زنده مانی	تعداد گیاهچه	تعداد ریشه	طول برگ	طول ریشه
تیمار	۸	۱۱۲/۱۰**	۴۷/۰۶**	۳۰/۳۲**	۱۳/۹۷**	۱۳/۳۱**
خطا	۱۸	۹/۴۲	۲/۱۲	۳/۲۲	۰/۸۴	۰/۸۴
ضریب تغییرات (درصد)		۹/۶۷	۱۰/۸۷	۱۳/۱۶	۱۱/۴۴	۱۱/۵۰

*و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین شاخص‌های بررسی شده نشان داد که بجز در شاخص تعداد ریشه، در مورد تمامی شاخص‌های بررسی شده تیمار T9 (۵ میکرومولار تیدیازرون + ۶ میکرومولار نفتالین استیک اسید) بهترین تیمار بوده است و منجر به تولید بیشترین تعداد گیاهچه و میانگین طول برگ (۳/۳۲میلی‌متر) (جدول ۸) و ریشه (۳/۵۶ میلی‌متر) و بالاترین نرخ زنده‌مانی (۱۰/۰۹) نسبت به سایر تیمارها شده است(جدول۸).

جدول ۸. مقایسه میانگین اثر تیمارهای پرآوری بر شاخص های رشد در گیاه زنبق مردابی.

محتوای هورمونی	کد اختصاری	زنده‌مانی	تعداد گیاهچه	تعداد ریشه	طول برگ (میلی‌متر)	طول ریشه (میلی‌متر)
NAA۰ TDZ+ ۱	T1	۴/۶۵^{e}	۱/۶۷^{f}	۱/۵۵^{g}	۱/۴۳^{de}	۰/۸۹^{e}
NAA۳ TDZ+ ۰	T2	۵/۴۵^{ed}	۱/۶۷^{f}	۲/۴۶^{fe}	۱/۰۷^{fe}	۱/۵۱^{d}
NAA۶ TDZ+ ۰	T3	۵/۲۳^{ed}	۱/۹۵^{ef}	۲/۹۶^{ed}	۱^{f}	۲/۲۰^{b}
NAA۰ TDZ+۲/۵	T4	۶/۱۰^{d}	۲/۴۰^{ed}	۱/۸۵^{fg}	۱/۵۳^{de}	۱/۴۹^{d}
NAA۳TDZ+ ۲/۵	T5	۸/۴۸^{bc}	۲/۸۲^{d}	۴/۰۸^{cb}	۱/۷۵^{dc}	۱/۶۴^{cd}
NAA۶TDZ+ ۲/۵	T6	۷/۷۵^{c}	۳/۶۱^{c}	۴/۹۹^{a}	۱/۸۶^{c}	۲/۰۸^{b}
NAA۰ TDZ+ ۵	T7	۹/۶۱^{ab}	۴/۵۷^{b}	۳/۵۱^{cbd}	۲/۴۴^{b}	۱/۵۰^{d}
NAA۳ TDZ+ ۵	T8	۹/۹۷^{a}	۴/۰۵^{cb}	۳/۳۳^{cd}	۲/۵۵^{b}	۳^{cb}
NAA۶ TDZ+ ۵	T9	۱۰/۰۹^{a}	۵/۶۳^{a}	۴/۱۴^{b}	۳/۳۲^{a}	۳/۵۶^{a}

NAA: نفتالین استیک اسید؛ TDZ: تیدیازرون. مقادیر ستون های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار می باشند.

بحث

تیمارهای اعمال شده بر روی ریزوم گیاه زنبق مردابی

به‌طورکلی در ریز نمونه‌هایی که از اندام‌های زیرزمینی مانند ریزوم، پیاز و طوقه تهیه می‌شوند آلودگی بالا بوده و تهیه ریز نمونه با حداقل آلودگی در آنها بسیار مشکل است. هیپوکلریت سدیم به‌عنوان یک ضدعفونی‌کننده‌ی عمومی توانایی کنترل محدود این آلودگی‌ها را دارد (Lin *et al.*, 1997; Bohlouli Zanjani, 2005). در بررسی انجام شده جهت ضدعفونی ریزوم پنج رقم آلسترومریا، نتایج نشان داد که هیپوکلریت سدیم بر کاهش آلودگی رقم جامائیکا تأثیر داشت، اما بر سایر ارقام تأثیر چندانی نداشت (Bohlouli Zanjani, 2005). این نتایج با نتایج پژوهش حاضر در مورد گونه زنبق مردابی همسو بود، چرا که استفاده از هیپوکلریت سدیم در هر دو پژوهش نتوانست آلودگی را در کشت بافت ریزوم به طور کامل کنترل کند. در پژوهشی جهت تعیین یک سیستم کشت بافت سریع برای گیاه از طریق ریزوم، محققین مشاهده کردند که جوانه‌های ریزوم تیمار شده با هیپوکلریت سدیم، آلودگی کامل از خود نشان دادند و میزان آلودگی‌زدایی و بقای ریز نمونه به طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر غلظت نانوذرات نقره استفاده شده در تیمارهای دیگر و زمان قرارگرفتن در معرض آن و اثرات متقابل آنها قرار گرفتند (Park *et al.*, 2021). در تیمار A7، تیمار دمایی توانست میزان آلودگی را به مقدار قابل‌توجهی کاهش دهد و تأثیر منفی بر رشد جوانه‌های موجود بر روی ریزوم گیاه زنبق مردابی نداشت، همچنین باعث افزایش درصد جوانه‌زنی ریزوم ها گردید. در پژوهشی تیمار دمایی ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ و یا ۱۰ دقیقه، در کنار آسکوربیک اسید و کلرامفنیکل به‌عنوان ترکیبات کمکی، روی جوانه های جانبی بامبو توانست به طور قابل‌ملاحظه‌ای میزان آلودگی قارچی را به ۱۱ درصد و حتی صفر کاهش دهد (Torres *et al.*, 2019). نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر مطابق با نتایج موفقیت‌آمیز این پژوهشگران می‌باشد.

استفاده از کلرید جیوه در تیمار A8، حتی با درنظرگرفتن زمان طولانی برای ضدعفونی و قراردادن نمونه‌ها به مدت یک شبانه‌روز در داخل شیکر موفقیت‌آمیز نبود و درصد آلودگی همانند تیمار A9 (یک دقیقه الکل ۷۰ درصد+ ۲۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم هیپوکلریت سدیم ۵درصد+ اضافه‌کردن کلرید جیوه به غلظت‌های ۵۰،۱۰۰،۱۵۰،۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت) بود. برخلاف نتایج پژوهش حاضر،کاربرد نانوذرات نقره در کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی در کشت بافت بادام موثر بود (Hatami *et al.*, 2019). همچنین، غلظت‌های بالای نانوذرات نقره میزان آلودگی در کشت درون شیشه‌ای جوانه‌های انتهایی و جانبی فندق را به میزان بالایی کاهش داده است، اما در عین‌حال باعث آسیب به ریز نمونه‌ها نیز شده است(Daryani *et al.*, 2015). گزارش‌های کمی تأیید کرده‌اند که تیمارهای نانوذرات نقره منجر به استریل‌کردن سطحی موفقیت‌آمیز شده است

1 *Kaempferia parviflora*

(Arab *et al.*, 2014). در کشت بافت ریزوم دو رقم از گیاه زینتی آلسترومریا، کنترل آلودگی در هر دو رقم تحت تأثیر کاربرد نانوذرات نقره موفقیت‌آمیز نبود (Shahriari *et al.*, 2011) که این نتایج با پژوهش حاضر مطابقت دارد. نتایج تیمار A12، با پژوهش انجام شده توسط فخرفشانی و همکاران (Fakhrfshani *et al.*, 2012) که کاربرد نانوذرات نقره در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم را در ضدعفونی ژربرا مفید دانستند، متفاوت بود.

از سیب‌زمینی شیرین آلوده در کشت‌های آزمایشگاهی سه سویه باکتریایی و سه سویه قارچی جدا شده است که تمام سویه‌های باکتریایی حساس به جنتامایسین بودند. تتراسایکلین و آمپی‌سیلین در جلوگیری از آلودگی حالت میانه داشتند (Jena & Samal, 2011). نمونه‌های عاری از آلودگی در کشت بافت با قرار دادن ریزنمونه‌ها به مدت یک ساعت در دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر جنتامایسین بدست آمد. تأثیر مفید استفاده از جنتامایسین در این پژوهش با پژوهش حاضر در تیمارA13 که از حمام بن‌ماری و آنتی‌بیوتیک و قارچ‌کش مورداستفاده قرار گرفته بود، همخوانی داشت. درکشت بافت زنبق آلمانی، آلودگی باکتری‌های اندوفیت مهم‌ترین مشکل و عامل محدود کننده در تکثیر سریع و تجاری این گیاه است. نتایج غربالگری تیمارهای داروهای آنتی‌بیوتیک داخلی نشان داد که سفالوسپورین‌ها و جنتامایسین بیشترین اثر مهاری را بر روی سویه‌های باکتریایی که به‌عنوان استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شناخته شده است، دارند. سفالوسپورین و جنتامایسین می‌توانند به‌عنوان عوامل ترجیحی برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی اندوفیت در گیاهچه‌های زنبق آلمانی استفاده شوند (Han *et al.*, 2017). این نتایج در اثر گسترده و مفید آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برای مهار اثرات نامطلوب باکتری‌ها در تیمار A13 همسو است.

بین تیمارهای انجام شده موفق‌ترین تیمار، تیمار A15 بود. استفاده از آنتی بیوتیک استرپتومایسین در کنترل آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌های زغال اخته نیز بیشترین تأثیر را داشت (Rezvanjoo *et al.*, 2016). در تحقیقی جهت حذف آلودگی باکتریایی از محیط کشت سیب‌زمینی، از آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، جنتامایسین و ریفامپسین و ترکیب جنتامایسین و ریفامپسین استفاده شد. نتایج نشان داد که جنتامایسین موثرترین آنتی بیوتیک بوده است و همه ده ژنوتیپ مورد استفاده در آزمایش قادر به باززایی و رشد در بالاترین دوز ریفامپیسین و جنتامایسین بودند (Gubišová & Gubiš, 2019). این یافته‌ها با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر که استفاده از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (به میزان ۲ میلی‌لیتر) در دومین تیمار برتر یعنی A13؛ سبب کاهش محسوس در میزان آلودگی (۱۶/۱۶ درصد) و به‌تبع آن افزایش میزان جوانه‌زنی ریزوم شد هم‌سو بود.

شکل ۵ . الف: جوانه‌زنی دانهال بذری زنبق مردابی در محیط درون شیشه‌ای. ب: رشد دانهال بذری استریل درون شیشه‌ای. ج: جوانه‌زنی ریز نمونه استریل شده ریزوم. د: رشد و ظهور برگ و ریشه قوی از ریز نمونه ریزوم در شرایط درون شیشه‌ای (منبع: یافته‌های تحقیق).

1*Staphylococcus epidermidis*

تیمارهای اعمال شده بر روی بذر گیاه زنبق مردابی

در تیمارهای اول تا ششم (حمام آب گرم+هیپوکلریت سدیم و هیدرو پرایمینگ+ هیپوکلریت سدیم) روی بذر گیاه زنبق مردابی از غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم استفاده شد که نتایج حاصل بیانگر تاثیر مفید غلظت‌های بالای هیپوکلریت سدیم در کاهش و از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بود. استفاده از غلظت های بالای هیپوکلریت سدیم (۰/۶ و ۰/۸ درصد) برای حذف آلودگی در کشت درون شیشه‌ای بذر گیاه *Dicentra×hybrida* سبب کاهش شدید میزان آلودگی شد، در حالی‌که در غلظت۰/۴درصد آلودگی به حدی بود که فقط ۱۰ درصد از نمونه‌ها سالم ماندند (Kulus, 2021). این نتایج با نتایج بدست آمده در مورد عدم تأثیر غلظت پایین هیپوکلریت سدیم در این پژوهش هم راستا بود. وجود آلودگی در نمونه‌های بذری تیمار چهارم (شستشو با آب جاری به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۲درصد به مدت ۲۰ دقیقه)، به علت غلظت کم هیپوکلریت سدیم استفاده شده بوده است. دومین رتبه در میزان آلودگی در تیمارهای اول (حمام آب گرم ۴۵ درجه سلسیوس + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه) و هفتم (قراردادن در محلول سود ۵درصد به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه) مشاهده شد. در ۱۲ تیمار باقیمانده میزان آلودگی بسیار کم و در حد صفر بود، اما در تیمارهای دهم تا پانزدهم (قراردادن در محلول سود + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه) با قرار دادن بذور در محلول سود ۱۰درصد و ۱۵درصد هر دو در سه بازه زمانی متفاوت (۲، ۶ و ۱۰ ساعت) درصد جوانه‌زنی صفر بود. گمان می‌رود که غلظت بالای سود (۱۰درصد و ۱۵درصد) در این تیمارها عامل عدم جوانه‌زنی بوده است. در پژوهشی که توسط گروهی از محققان (Sun *et al*., 2006) انجام شد از غلظت ۱۴/۳۸مولار سود برای بهبود جوانه‌زنی بذر گونه‌ای زنبق[1] به مدت صفرتا ۲۸ ساعت استفاده شد، نتایج نشان داد که استفاده از سود برای مدت بیشتر از ۲۰ ساعت نه‌تنها باعث بهبود جوانه‌زنی نمی‌شود بلکه باعث کاهش میزان جوانه‌زنی نیز می‌گردد. گمان می‌رود که تیمار مدت‌زمان طولانی و غلظت‌های بالا تأثیر معکوس روی جوانه‌زنی دارند. آنان بیان کردند که درصد مرگ‌ومیر نمونه‌ها تحت‌تأثیر غلظت و مدت‌زمان قراردادن نمونه‌های بذر در داخل محلول هیدروکسید سدیم قرار دارد. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر که غلظت‌های بالای هیدروکسید سدیم مانع از جوانه‌زنی و باعث مرگ بذر شده است در یک‌جهت قرار دارد.

در تیمار هفتم (قراردادن در محلول سود ۵درصد به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه) استفاده‌کردن از محلول هیدروکسید سدیم ۵ درصد به مدت ۲ ساعت به همراه هیپوکلریت سدیم ۳درصد، منجر به افزایش میزان جوانه‌زنی شد. در گزارشی پژوهشگران بیان کردند که خراش دادن بذر به کمک هیدروکسید سدیم (با خاصیت قلیایی) و به دنبال آن استفاده از هیپوکلریت سدیم، ۵۹ درصد میزان جوانه‌زنی را در گونه زنبق[2] افزایش داد (Waňg *et al*., 2018) که این نتایج با پژوهش حاضر هم‌سو بوده است. پوشش بذر در زنبق و چندین گیاه دیگر نقش بازدارنده‌ای در فرایند جوانه‌زنی دارد زیرا به دلیل بازدارنده‌های موجود در این بخش بذر خواب خود را حفظ می‌کند و با جلوگیری از نفوذ آب و تبادل گازها، یک مانع مکانیکی برای جنین ایجاد می‌کند. بنابراین ،روش‌های مختلفی برای خراشیدگی، لایه‌برداری و حذف پوشش بذر برای شکستن خواب بذر و بهبود جوانه‌زنی ایجاد شده است. به طور خاص، خراش دادن قلیایی با هیدروکسید سدیم برای افزایش نفوذپذیری پوشش دانه شناخته شده است که منجر به شکست خواب می‌شود. در بیشتر گونه‌های زنبق، جوانه‌زنی با حذف پوشش بذر به طور قابل‌توجهی بهبود می‌یابد. این‌کار منجر به افزایش نفوذپذیری غشا می‌شود و برخی از بازدارنده‌های درون‌زا را حذف می‌کند. دردانه‌های زنبق، زمانی که اندوسپرم از انتهای میکرو پیلار برداشته شد، ۹۳/۳ درصد جوانه‌زنی حاصل شد، درحالی‌که حذف پوشش بذر به‌تنهایی، ۵۵/۶ درصد جوانه‌زنی را به‌همراه داشت. مقایسه با حدود ۳/۳ درصد جوانه‌زنی در نمونه های شاهد (بدون حذف پوشش دانه) نشان‌دهنده نقش بازدارندگی قوی پوشش دانه در جوانه‌زنی است. در گونه‌ای زنبق

1*Iris lacteal* var.*chinensis*
2*Iris sanguinea*

I. saguinea ، حذف پوشش بذر، پس از خیساندن آنها در هیدروکسید سدیم ۵ درصد به مدت ۲ ساعت، منجر به افزایش جوانه‌زنی شد درحالی‌که تیمارهای طولانی مدت احتمالاً به جنین آسیب می‌رساند.

بذرهای گیاه زنبق معمولاً خواب فیزیولوژیکی دارند و معمول است که قبل از برداشتن پوشش دانه، دانه‌ها را در دمای سرد قرار می‌دهند یا در آب گرم خیسانده و یا از ترکیبات قلیایی استفاده می‌کنند تا خواب بذر را بشکنند (Lu *et al*., 2017 & Sun et al., 2006). تیمار A2 (حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه) با استفاده از آب گرم هم به جهت ازبین‌بردن خواب بذر و هم به جهت کنترل و ازبین‌بردن آلودگی موفقیت‌آمیز بود. در تیمار A5 (شستشو با آب جاری به مدت ۲ ساعت + هیپوکلریت سدیم ۴درصد به مدت ۲۰ دقیقه)، از آب جاری به مدت ۲ ساعت ولی از هیپوکلریت سدیم با غلظت ۴درصد و به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. این روش که به روش هیدروپرایمینگ معروف است روشی است که در آن، بذرها با آب خالص و بدون استفاده از هیچ ماده شیمیایی تیمار می‌شوند که این نوع پیش تیمار بسیار ساده، ارزان و بی‌خطر است و مقدار جذب آب از طریق مدت زمانی که بذرها در تماس با آب هستند کنترل می‌شود (Judi & Sharifzadeh, 2006). در تیمار A7 از محلول سود ۵ درصد به مدت ۲ ساعت به همراه هیپوکلریت سدیم ۳درصد استفاده شدکه افزایش جوانه‌زنی را به دنبال داشت.

تیمارهای پرآوری

از جمله مهمترین مراحل کشت بافت، مرحله پرآوری[1] است که در آن اقدام به افزایش تعداد گیاهچه می‌شود. در مرحله پرآوری معمولا نسبت سیتوکینین‌ها به اکسین‌ها بیشتر است. در پژوهشی روی زالزالک ، بهترین محیط مناسب جهت پرآوری محیط MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید گزارش شده است (Moghimi& Safarnejad, 2014). در پژوهشی دیگر (Doğan & Caglar, 2018) بر روی گونه‌ای از زنبق بیشترین میزان زنده‌مانی در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA و بیشترین میزان شاخه زایی در در غلظت ۲ میلی گرم برلیتر بنزیل آمینوپورین + ۲ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید رخ داد. در بررسی دیگر بر روی یکی از گونه‌های زنبق (*Iris pseudopallida* .Trinajstic)، بیشترین میزان تولید شاخه (میانگین ۴/۲ عدد) در محیط کشت حاوی تیدیازرون به غلظت ۲/۲ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد؛ پژوهشگران بیان کردند که با افزایش غلظت تیدیازرون، نرخ شاخه‌زایی نیز افزایش پیدا کرد؛ نتایج این پژوهش، با تحقیق حاضر در تاثیر بالای تیدیازرون در افزایش میزان شاخه‌زایی با افزایش غلظت این هورمون، هم‌سو بوده است (شکل۹).

در حقیقت تیدیازرون یک جانشین فنیل اوره است و مانند یک سیتوکینین قوی عمل می‌کند (Jevremović *et al*., 2008). در بررسی دیگر محققین از سه نوع سایتوکینین تیدیازرون، بنزیبل آمینو پورین، پیکلورام و نفتالین استیک اسید بر روی ریزازدیادی گیاه آگلونما استفاده کردند، در این پژوهش[2] نیز تاثیر بالای کاربرد تیدیازرون بر شاخه‌زایی گیاه آگلونما محسوس بود. همچنین بهترین غلظت هورمون NAA بر پرآوری گیاه آگلونما را ۲ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردندکه این تاثیر نیز هم‌راستا با پژوهش حاضر می‌باشد.

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف تیدیازرون و نفتالین استیک اسید در گیاهی مثمر و زینتی ، با هدف تکثیر درون شیشه‌ای[3] این گیاه با ارزش گزارش شد که که غلظت ۰/۵ میکرومولار از نفتالین استیک اسید به همراه غلظت ۳/۲ میکرومولار تیدیازرون باعث تشکیل شاخه‌ها و جوانه‌های متعدد در ریزنمونه‌ها شد، در حالیکه غلظت‌های بالای تیدیازرون (۱۳/۶ میکرومولار) باعث بروز حالت شیشه‌ای و آسیب به ریزنمونه‌ها می‌شود. در این گیاه با توجه به تعداد شاخه‌های متغیر تولید شده توسط ریزنمونه، غلظت بالای تیدیازرون همراه با نفتالین استیک اسید باعث تشکیل جوانه و در ادامه شاخه‌دهی شد. کاهش اولیه تعداد جوانه‌های

1Proliferation
2 *Aglaonema widuri*
3*Eugenia involucrata* DC.

تولید شده به طور بالقوه با تورم نواحی جوانه زنی ریزنمونه‌ها (محل جوانه های خفته) و افزایش غلظت تیدیازرون مرتبط بوده‌است. این کاهش بیشتر در فاصله بین غلظت ۲ و ۱۶ میکرومولار تیدیازرون رخ داد (Golle *et al*., 2017). با این حال، بالاترین غلظت ارائه شده، محرکی برای افزایش تعداد جوانه های تولید شده در ریزنمونه مورد نیاز بود. این امر مشابه نتیجه این پژوهش در مرحله پرآوری گیاه زنبق مردابی بود، که با بالاتر رفتن میزان غلظت هر دو هورمون میزان تمامی شاخص‌های رشد و زنده‌مانی افزایش پیدا کرد. در مورد پژوهش حاضر، می‌توانیم استنباط کنیم که در غلظت‌های کم، تعادل بین اکسین و سیتوکین برای تشکیل شاخه‌ها کافی نبود، زیرا با هورمون‌های اضافه شده به محیط‌کشت، به احتمال زیاد ریزنمونه‌ها دارای سطوح درون‌زای کم اکسین و سیتوکینین بوده‌اند و برای متعادل کردن آن، این هورمون‌ها را از محیط‌کشت دریافت کردند و این امر باعث افزایش رشد شد. در نهایت سطوح سیتوکین و اکسین بالا تولید شاخساره و ریشه را افزایش داد.

شکل ۶. پرآوری درگیاه زنبق مردابی (منبع: یافته های تحقیق).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، استفاده از ترکیباتی مانند سود، آب گرم و یا هیدروپرایمینگ از بهترین روش‌ها جهت سترون‌کردن بذرهای زنبق آبی می‌باشد و ضدعفونی بذر آسان‌تر صورت می‌گیرد. در ریز نمونه‌های بذری تیمار دوم (حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس + هیپوکلریت سدیم ۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه) به جهت استفاده از آب گرم و هیپوکلریت‌سدیم ۳ درصد و تیمار B5 (استفاده از روش هیدروپرایمینگ با استفاده از آب جاری و قراردادن در هیپوکلریت‌سدیم۲ درصد) بالاترین میزان جوانه‌زنی (۷۱/۷۴ درصد) و کمترین آلودگی (تقریبا صفر) به‌دست آمد. در مورد ریزوم گیاه زنبق مردابی، از آنجایی که اندام زیرزمینی با دامنه وسیع‌تری از آلودگی‌ها در تماس است و محیط رشد این گیاه در نواحی مردابی و کنار رودها و نهرهای آب است که مکان‌هایی با آلودگی وسیع‌تری می‌باشند، لذا سترون‌سازی ریزوم این گیاه به مراتب دشوارتر از بذر است. استفاده از هیپوکلریت سدیم به‌تنهایی نتوانست آلودگی‌های باکتریایی و قارچی این گیاه را کنترل کند. نتایج حاصل از بررسی شاخص‌ها نشان داد که تیمار پانزدهم ریز نمونه‌های ریزوم (بعد از ضدعفونی به مدت ۶۰ دقیقه با حمام آبگرم با دمای ۴۶ درجه+ قارچ‌کش فلوکونازول+ آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین+ الکل ۷۰ درصد+ هیپوکلریت سدیم ۴ درصد)، با درصد آلودگی ۱۱درصد و میزان جوانه‌زنی ۸۸ درصد، برترین تیمار بود و تیمار سیزدهم (استفاده از ۶۰ دقیقه حمام آبگرم با دمای ۴۲ درجه سلسیوس + ۶۰ دقیقه قراردادن در قارچ‌کش فلوکونازول۱۵۰ میلی‌گرم (۳کپسول) + محلول آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به میزان ۲میلی‌لیتر+ کلینداماسین ۳۰۰میلی‌گرم (۴کپسول) +یک دقیقه الکل ۷۰درصد+ ۱۰ دقیقه هیپوکلریت سدیم۳ درصد) با

جوانه‌زنی ۸۵ درصد و آلودگی ۱۵ درصد دومین تیمار برتر بود. به طور کلی استفاده از حمام آب گرم تحت دمای ۴۲و ۴۶ درجه سلسیوس و استفاده از ترکیبات قارچ‌کش بنومیل و فلوکونازول و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، جنتامایسین و کلینداماسین در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تربنافین و نیستاتین اثربخشی بالاتری را نشان دادند و قارچ‌کش بنومیل و فلوکونازول نسبت به کلوتریمازول تأثیر بیشتری در کنترل آلودگی شدید قارچی در ریزوم گیاه زنبق مردابی داشت. کم‌خطر بودن و تأثیر بسیار مفید حمام آب گرم در کنار ترکیبات قارچ‌کش و آنتی‌بیوتیک می‌تواند روش بهتر و کارآمدتری در کنترل آلودگی ریز نمونه‌های حاصل از ریزوم گیاه زیبای زنبق مردابی بجای استفاده از مواد سمی، خطرناک و البته پرضرر باشد. همچنین بکار گیری هورمون تیدیازرون به عنوان یکی از قوی‌ترین سایتوکینین‌ها در غلظت ۵ میکرومولار و نفتالین استیک اسید به عنوان منبع اکسین، در غلظت ۶ میکرومولار بهترین و موفق‌ترین تیمار پرآوری گیاه زنبق مردابی می‌باشد.

منابع

بهلولی زنجانی، سحر (۱۳۸۴). بررسی کشت درون شیشه‌ای گیاه آلسترومریا. *پایان نامه کارشناسی ارشد*. به راهنمایی یوسف حمیداوغلی و عبداله حاتم زاده. ۱۰۰ص.

جودی، مهدی و شریف زاده، فرزاد (۱۳۸۳). بررسی اثر هیدروپرایمینگ در ارقام مختلف جو. نشریه بیابان، ۱۵(۹)، ۱۰۱-۹۱.

حاتمی، الناز؛ شکوهیان، علی اکبر؛ قنبری، علیرضا و ناصری، لطفعلی (۱۳۹۸). تأثیر نانونقره بر آلودگی باکتریایی و شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بادام GN15 کشت بافتی. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۰(۱)، ۱۱۹-۱۲۸.

دریانی، پریسا؛ زارع، ناصر؛ چمنی، اسماعیل؛ شیخ زاده مصدق، پریسا و جوادی مجدد، داوود (۱۳۹۴). تاثیر نانوذرات نقره بر آلودگی میکروبی و رشد درون شیشه ای جوانه های جانبی و انتهایی ارقام فندق. *نشریه فن آوری زیستی در کشاورزی (پژوهش کشاورزی)*، ۱۴(۱) ، ۳۱-۲۱.

رضوان جو، نوید؛ قنبری، علیرضا؛ محب الدینی، مهدی و ترابی گیگلو، موسی (۲۴ بهمن، ۱۳۹۶). *تاثیر کابرد آنتی بیوتیک استرپتومایسین در محیط کشت، برای از بین بردن آلودگی باکتریایی ریزنمونه های زغال اخته* (*Cornus mas* L.). کنفرانس بین المللی علوم کشاورزی، گیاهان دارویی و طب سنتی،مشهد، ایران.

شهریاری، امیرغفار؛ باقری، عبدالرضا؛ شریفی، احمد و مشتاقی، نسرین (۱۳۹۰). کنترل آلودگی ریزنمونه های ریزوم گیاه آلسترومریا (*Alstroemeria* sp.) در شرایط این ویترو. *نشریه علوم باغبانی*، ۲۵(۱)، ۱۱۵-۱۰۹.

فخرفشانی، مسعود؛ باقری، عبدالرضا و شریفی، احمد (۳۱ اردیبهشت، ۱۳۹۱). بررسی اثر زمان و غلظت های مختلف نانوذرات نقره بر کنترل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی کشت این ویتروی کاپیتول ژربرا *(Gerbera Jamesonii)*، *دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران،تهران*.

قهرمان، احمد. (۱۳۷۳-۱۳۵۷). *فلور رنگی ایران* جلد ۱۷. تهران، انشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران.

مقیمی، زهرا و صفرنژاد، عباس (۱۳۹۳). بررسی ریزازدیادی و میزان فلاونوئید زالزالک (*Crataegus* sp.) از طریق کشت بافت. *تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران*، ۲۲(۲)، ۱۸۱-۱۹۱.

Arab, M., Yadollahi, M., Hosseini-Mazinani, A., & Bagheri, S. (2014) Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on in vitro establishment of G × N15 (hybrid of almond × peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 12(4), 103–110.

Bohlouli Zanjani, S. (2005). *Study of tissue culture in vitro of Alstroemeria*. [MSc thesis, University of Guilan]. (In Persian).

Buckseth, T., Singh, R. K., Sharma, A. K., Sharma, S., Modgil, V., & Saraswati, A. (2017). Effect of streptomycin and gentamycin on in vitro growth and cultural contaminants of potato cultivars. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 4038-4043.

Cao, X., & Hammerschlag, F.A. (2000). Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. *HortScience*, 35(5), 945-947.

Cao, X., Hammerschlag, F. A., & Douglass, L. (2002). A two-step pretreatment significantly

enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bluecrop. *HortScience*, 37(5), 819-821.

Chang, H. S., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., & Paek, K. Y.,. (2003). Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) *via in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39(12), 129–134.

Daryani, P., Zare, N., Chamani, E., Shiekhzadeh Mosadegh, P., & Javadi, D. (2015). The effect of silver nano-particles on microbial contamination and *in vitro* growth of apical and auxiliary buds of *Biotechnology in Agriculture*, 14(1), 21–31. (In Persian).

Doğan, S., & Caglar, G. (2018). In Vitro Shoot Proliferation via Immature Embryos of *Iris kirkwoodiae* Chaudhary. *ANADOLU Journal of Aegean Agricultural Research Institute*, 28(2), 48-54 .

Fakhrfshani, M., Bagheri, A., & Sharifi, A. (2012). *The effect of time and different concentrations of silver nanoparticles on the control of fungal and bacterial contamination of this vitreous culture of Gerbera Jamesonii Capitol*. 12th Iranian Genetic Conference, Tehran, Iran. 20 May. 23–31. (In Persian).

Fisse, J., Batalle, A., & Pera, J. (1987). Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. *Acta Horticulturae*, 212(11), 87–90.

Ghahreman, A. (1978-2003). Flora of Iran in colour,.Research Institute of Forests & Rangelands. Tehran, 1-24. (In Persian).

Gubišová, M., & Gubiš, J. (2019). Growth of potato shoot cultures on media with antibiotics for elimination of bacterial contamination. *Agriculture*, 65(3), 99–106.

Golle, D. P., Reiniger, L. R. S., Stefanel, C. M., Muniz,M. F. B., & Silva, K. B. (2017). Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. *Revista Árvore*, 41(5), 1-7.

Gwon, S. H., Heo, J. Y., & Kim, B. S. (2019). Identification and control of microbial contaminants during *in vitro* culturing of 'Atlantic' potatos. *International Journal of Horticultural Science Technology*, 37(4), 528–539.

Han, H., Liao, Q., Marbaha, W., Wang, H., Zhuang, H., & Wang, Q. (2017). Isolation, identification and screening of eEndophytes fungicides for disease control during tissue culture of german irises. Xinjiang. *Agricultural Sciences*,54(4), 20–25.

Habiba, U., Reza, S., Saha, M. L., khan, M. R., & Hadiuzzaman, S. (2002). Endogenous bacterial contamination during in vitro culture of table banana identification and prevention. *Plant Tissue Calture*. 12, 117-124.

Hatami, E., Shokoohian, A. A., Ghanbari, A. R., & Naseri, L. A. (2019). Effects of nano silver on bacterial contamination and morphological and biochemical indices of *in vitro* GN15 almond rootstock. *Iranian Journal of Horticultural Science*. 50(1), 119–128. (In Persian).

Jena, R. C., & Samal, K. C. (2011). Endogenous microbial contamination during *in vitro* culture of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]: identification and prevention. *Journal of Agricultural Technology*, 7(6), 1725–1731.

Jevremović, S., Subotić, A., Trifunović, M., Nikolić, M., & Radojević, L. (2008). *In vitro* plant regeneration of *Iris pseudopallida*. In J. A. Teixeira da Silva (Ed.) *Floriculture*. *Ornamental and Plant Biotechnology* .(pp. 250–252). Global Science Books, Japan.

Judi, M., & Sharifzadeh, F. (2006). Investigation the effect of hydropriming in barley cultivars. *Biaban Journal*, 15(9), 91–101. (In Persian).

Kromer, K. D. (1985). Regeneration of some monocotyledonous plants from subterranean organs *in vitro*. *Acta Agrobotanica*, 38(2), 65–87.

Kulus, D. (2021). Establishment of an efficient *in vitro* culture system in *Dicentra* × *hybrida*. *Biology and Life Sciences Fourm*, 4(4), 2–5.

Kritzinger, E. M., Jansen. van Vuuren, R., Woodward, B., Rong, I. H., Spreeth, M. H., & Slabbert, M. M. (1998). Elimimation of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics. *Plant Cell, Tissue and Organ. Culture*,

52(2), 61–65.
Leifert, C., Camotta, H., & Waites, W. M. (1992). Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29(2), 153–160.
Lin, H. S., De Jeu, M. J., & Jacobsen, E. (1997). Direct shoot regeneration from excised leaf explants of *in vitro* grown seedling of *Alestromeria*. *Plant cell reports*, 16(11), 770–774.
Lu, M. Y., Du, Y., & Bi, X. Y. (2017). Research on seed dormancy and germination characteristics of five wild *Iris* species. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 37(9), 1823–1830.
Marcotrigiano, M., McGlew, S. P., Hackett, G., & Chawla, B. (1996). Shoot regeneration from tissuecultured leaves of the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Plant cell, tissue and organ culture*, 44(3), 195-199.
Marinescu M., Teodorescu A., & Sutan N. (2013). Preliminary results on the in vitro propagation by leaf explants and axillary buds of Iris aphylla L. J. Horticult. For. Biotechnol. 17, 279–282.
Mbah, E. I., & Wakil, S. M. (2012). Elimination of bacteria from in vitro yam tissue cultures using antibiotics. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 53–58.

Mol, J., Vivas Salim, M. J., Chemparathy, Sh. M., Karim, R., & Balakrishnan T. U. (2016). An efficient protocol for raising contamination free micropropagation of *Zingiber Officinale* (Ginger). *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4(5), 145–148.
Moghimi, Z., & Safarnejad, A. (2014). Assessment of micropropagation and flavonoid content of hawthorn through tissue culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 22(2), 181-191. (In Persian).
Oo, K. T., Oo, K. S., & Mon, Y. Y. (2018). Establishment of efficient surface sterilization protocol on different types of field grown strawberry explants (*Fragaria* × *ananassa* Dutch.). *Journal of Scientific and Innovative Research*, 7(3), 70–74.
Park, H. Y., Kim, K. S., Ak, G., Zengin, G., Cziáky, Z., Jekö, J., Adaikalam, K., Song, K., Kim, D. H., & Sivanesan, I. (2021). Establishment of a rapid micropropagation system for *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker: Phytochemical analysis of leaf extracts and evaluation of biological activities, *Plants*. 10(4), 683–698.
Patel, A., Patil, G., Mankad, M., & Subash, N. (2018). Optimization of surface sterilization and manipulation of *in vitro* conditions for reduced browning in pomegranate (*Punica granatum* L.) variety *Bhagava. International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 8–23.
Pedersen, C., & Brandt, K. (1992). A method for disinfection of underground rhizome of *Alestromeria* and *Heliconia*. *Acta Horticulturae*, 325(69), 499–504.
Reed, B. M., & Abdelnour-Esquivel, A.(1991). The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *Horticultural Science*, 26(11), 1320-1322.
Reuther, G. (1977). Embryoide differenzierungsmuster im kallusder Gattungen *Iris* und *Asparagus*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 90(2), 417–437.
Rezvanjoo, N., Ghanbari, A., Mohebulddini, M., & Torabi Giglo, M. (2018, Februery, 13). *The effect of streptomycin antibiotic application in culture medium to eliminate bacterial contamination o*f (*Cornus mas* L.) *explants*. International Conference of Agricultural Sciences, Medicinal Plants and Traditional Medicine, Mashhad, Iran. (In Persian).
Shahriari, A. G., Bagheri, A., Sharifi, A., & Mushtaqi, N. (2011). Infection control of rhizome samples of *Alstroemeria* (*Alstroemeria* sp.) under *in vitro* conditions. *Journal of Horticultural Sciences*, 25(1), 109–115. (In Persian).
Sinha Ray, S., & Ali, N. (2016). Biotic Contamination and Possible Ways of Sterilization: A Review with Reference to Bamboo Micropropagation. *Agriculture, Agrobusiness and Biotechnology*. 59(2), 1–12.
Sivanesan, I., Muthu, M., Gopal, J., Tasneem, S., Kim, D.-H., & Oh, J.-W. (2021). A fumigation-based uurface sterilization approach for plant tissue culture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), 2282.
Srivastava, P., Kasoju, N., Bora, U., & Chaturvedi, R.(2010). Accumulation of betulinic, oleanolic,

and ursolic acids in in vitro cell cultures of *Lantana camara* L. and their significant cytotoxic effects on HeLa cell lines. Biotechnol Bioproc E. .15:1038–1046.

Sun, Y. J., Zhang, K., Wang L., & Qiu, X. J. (2006). NaOH scarification and stratification improve germination of *Iris lactea* var. *chinensis* seed. *HortScience*, 41(3), 773–774.

Teixeira da Silva, J. A., Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Disinfection procedures for *in vitro* propagation of *Anthurium. Folia Horticulturae*, 27(1), 3–14.

Tikhomirova, L. (2017). Morphogenesis and histology of cultures of *Iris ensata* Thunb. Generative Organs. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 53, 270-3.

Tikhomirova, L. (2020*). Scientific framework for selecting explants of Iris* L. *genus for direct shoot regeneration*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 421 052014.

Torres, G. R. C., Coutinho, F. P., Araújo, B. G. P., Abreu, G. P., & Júnior, R. S. (2019). Thermotherapy as a microbial contaminant-reducing agent in micropropagation of bamboo. *Agricultural and Biological Sciences*, 32(3), 690–697.

Wang, L., Du, Y., Rahman, M. M., Tang, B., Fan, L. J., & Kilaru, A. (2018). Establishment of an efficient in vitro propagation system for *Iris sanguinea*. *Scientific reports*, 8(1), 17100. doi: 10.1038/s41598-018-35281-y.

Young, P. M., Hutchins, A. S., & Canfield, M. L. (1984). Use of antibiotics to control the bacteria in shoot cultures of woody plants. *Plant Science Letters*, 34(1–2), 203–209.