مقایسه درون شیشه‌ای اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف اتانول و هیپوکلریت سدیم بر قطعات گره‌دار شاخه‌های فرعی نسترن وحشی (*Rosa canina* L.)

محبوبه رحیمی [۱*]، وحید روحی [۲]، عبدالرحمان محمدخانی [۲]، علی اکبر فدایی تهرانی [۳]، حمید رضا کبیری [۴]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد.
۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد. ۴- کارشناس گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد.
*تویسنده مسئول

چکیده

نسترن وحشی (*Rosa canina L.*)، گیاهی دارویی و یکی از پایه‌های گل رز است. به‌دلیل وجود مشکلات تکثیر از طریق بذر و قلمه و نیز به‌علّت بروز آلودگی‌های نامشخص درونی در ریزنمونه‌های مختلف آن در شرایط درون‌شیشه‌ای، تحقیق حاضر در جهت دست‌یابی به روش تکثیر سریع از طریق کشت بافت و با هدف تعیین روش مناسب ضدعفونی قطعات‌گره‌دار شاخه فرعی نسترن وحشی صورت‌پذیرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه‌کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. تیمارها شامل محلول‌های اتانول (۰، ۵۵، ۷۰ و۸۵ ٪ به‌مدّت ۲۰ ثانیه) و هیپوکلریت‌سدیم (۰، ۵، ۱۰ و۱۵٪ به‌مدّت ۱۰ دقیقه) بودندریز نمونه‌ها پس از تیمار به‌صورت افقی روی محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد قرارداده شدند. پس ازگذشت ۱۴ روز، بیش‌ترین میزان آلودگی در تیمار شاهد و تیمارهای فاقد الکل مشاهده گردید. کم‌ترین آلودگی در تیمارهای ترکیبی اتانول۷۰ و ۸۵ ٪ به‌همراه هیپوکلریت‌سدیم۱۰ و ۱۵٪ مشاهده‌شد. کاربرد الکل ۸۵ ٪ گرچه میزان آلودگی را کاهش داد ولی باعث ایجاد اثرات فنولیکی در۲ سر ریزنمونه و شیشه‌ای‌شدن نوساقه‌ها شد. میزان عفونت قارچی بیش‌تر از آلودگی باکتریایی بود. قارچ ناشناسی (شبیه به خصوصیات جنس *Alternaria*) یافت شد. قارچ‌های *Rhizopus* sp.، *Rizoctonia* sp. و *Penicillium* sp. نیز شناسایی شدند. در تیمارهایی که فقط آلودگی مخمری داشتند، میزان استقرار ریزنمونه نسبت به میزان آلودگی افزایش داشت. با توجه به میزان پراکندگی عفونت‌ها، پیشنهاد می‌شود؛ جهت ضدعفونی قطعات‌گره‌دار نسترن، از اتانول۷۰٪ به مدّت۱ دقیقه و هیپوکلریت‌سدیم-۱۰٪ به‌مدّت ۱۵دقیقه استفاده‌شود.

واژگان کلیدی: *Rosa canina* L.، اتانول، هیپوکلریت‌سدیم، قارچ

مقدمه

نسترن وحشی (*Rosa canina* L.) از خانواده Rosaceae، به فرم درختچه‌ای و دارای ساقه‌های عمودی یا کمانی به طول حداکثر ۵ متر می‌باشد. مقدار زیادی آنتی‌اکسیدانت دارد. بذر منبع خوبی از ویتامین E و میوه غنی از ویتامین‌های A، C و E، فلاونوئیدها، و سایر ترکیبات مفید است (۱۶). از آن به‌عنوان پایه برای *Rosa hybrida* و *Rosa floribunda* استفاده می‌شود (۵ و ۱۴). معمولاً با بذر تکثیر می‌شود ولی به سختی جوانه می‌زند. ازدیاد تجاری آن از طریق قلمه، با سرعت ریشه‌زایی کم و صرف هزینه بسیار صورت می‌گیرد (۹). ضدعفونی نمودن بافت‌های گیاهی با مواد شیمیایی، به منظور رهایی یافتن از میکروارگانیسم‌های موجود در سطح اندام‌های گیاهی انجام می‌شود. ضدعفونی‌کننده‌ها به ۵ گروه دارای عامل آلکیلات، سولفوهیدریل، اکسیدازی، دهیدراته و عوامل نفوذپذیر تقسیم می‌شوند. الکل‌ها با تأثیر مستقیم بر گروه عاملی S-H باعث شکسته‌شدن غشاءسلولی، انحلال چربی‌ها و غیرطبیعی نمودن پروتئین‌ها می‌شوند (۱۰و۱۷). اتانول دارای عامل دهیدراته است که باعث تخریب اجزاءسلولی می‌شود (۱۱). محلول آبدار اتیل‌الکل یا اتانول به‌وسیله‌ی میکروارگانیسم‌هایی نظیر مخمر تولید می‌شود. اتانول در فرآیند تخمیر از قندهایی مثل ساکارز، هیدرولیز نشاسته، گلوکز، سلولز و سایر قندها مشتق می‌شود. مخمرها، قندها را مصرف نموده و آن‌ها را به الکل‌های خطی نظیر اتانول تبدیل می‌کنند (۱۷). هیپوکلریت‌سدیم اثر اکسیدازی بر میکروارگانیسم‌ها دارد و لیپید، پروتئین و DNA آن‌ها را مورد حمله قرار می‌دهد (۱۰). آلودگی باکتریایی و قارچی اندام‌های گیاهی معمولاً ظرف ۱ تا ۱۴ روز پس از انجام عمل‌کشت قابل

تشخیص خواهدبود (۱). با بررسی تحقیقات انجام شده در زمینه کشت بافت انواع رز، با روش‌های ضدعفونی گوناگونی روبه‌رو می‌شویم (۱۲). در آزمایشی شیردل و همکاران (۲۰۱۳)، جهت کشت قطعات خشبی‌گره‌دار نسترن وحشی، ابتدا ریزنمونه‌ها را به مدّت۱ساعت با آب جاری شستشو دادند، سپس به‌ترتیب از توین۸۰ (Tween 80) ۰/۱ ٪ به‌مدّت ۱۵ دقیقه ، اتانول۷۰ ٪ به‌مدّت ۵ دقیقه، کلرید مرکوری (mercury (II) chloride) ۰/۱ ٪ حجمی- وزنی (w/v) به مدّت ۲ دقیقه و در نهایت از هیپوکلریت‌سدیم به‌مدّت۲۰ دقیقه استفاده‌نمودند. اسماراندا (۲۰۱۱)، در تحقیقی در رابطه با ریزازدیادی نسترن وحشی، از اتانول۷۰ ٪ به مدّت ۵ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم ۳ ٪ به مدّت۱۰ دقیقه برای جوانه‌های تازه رشد یافته‌ی ساقه‌های جوان استفاده نمود. استیکن و ارکیسلی (۲۰۰۱)، قطعات‌گره‌دار ساقه‌های نسترن را توسط اتیل‌الکل۷۰ ٪ به‌مدّت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم به‌مدّت تقریباً۲۰ دقیقه ضدعفونی نمودند. آسیب‌شناسی گونه‌های رز، در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای متفاوت‌است (۱۲ و ۱۳). بنابراین، پس از انتخاب اندام گیاهی مناسب جهت کشت، دستورالعمل ضدعفونی‌کردن، به عنوان اوّلین مسئله بایستی مدّنظر قرارگیرد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در اوایل خردادماه سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه شهرکرد به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور ضدعفونی اتانول و هیپوکلریت‌سدیم هر کدام در ۴ سطح و ۴ تکرار اجراگردید. ریزنمونه‌ها از شاخه‌های فرعی وسطی درختچه‌ای در مرحله گلدهی، واقع در محوطه مجموعه گلخانه‌های دانشگاه شهرکرد، به طول ۱/۵ سانتی‌متر و قطر۲/۷۰ تا ۳/۶۳ میلی‌متر تهیّه‌شدند. ۲ ماده شیمیایی اتانول ۹۶ درجه با غلظت‌های (۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ ٪) در مدّت زمان۲۰ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم حاوی کمتر از ۱٪ NaOH و ۶ تا ۱۴٪ کلر فعّال (تولید شرکت مرک آلمان) با غلظت‌های (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵٪) در مدّت۱۰ دقیقه) به‌مقدار۱۰۰ میلی‌لیتر به‌کاربرده شد. در تهیّه محلول‌ها و در مرحله آب‌شویی از آب مقطر استریل استفاده شد. ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار ۳ بار با آب مقطر استریل و هربار به مدّت ۵ دقیقه آب‌شویی شدند. در حین مدّت استریل نمودن و شستشو، ظرف به آرامی و به‌طور مداوم تکان داده می‌شد. سپس در شرایط کاملاً استریل روی محیط کشت MS فاقد مواد تنظیم کننده‌ی رشد، حاوی۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم آگار و pH ۵/۷، کشت داده‌شدند. سپس به مدّت ۱۴ روز در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره فتوپریودی ۸ ساعت تاریکی، ۱۶ساعت روشنایی با لامپ‌های فلورسنت (۶۰۰۰ لوکس) نگهداری شدند. داده‌ها پس از تبدیل زاویه‌ای، از طریق تبدیل درصدها به $\arcsin\sqrt{Y}$ (۶)، توسط نرم افزار SAS 9.1 تجزیه گردید و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون LSD ۰،۰۵ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

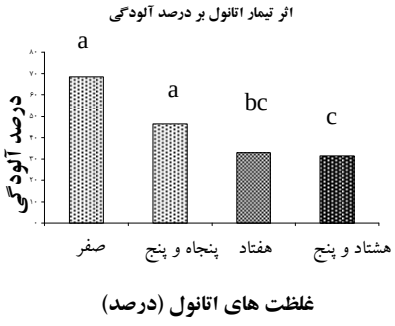
با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱)، تیمار اتانول، بر میانگین درصد استقرار ریزنمونه‌ها اثر معنی‌داری ندارد، امّا نسبت به میانگین درصد آلودگی اختلاف بسیار معنی‌داری دارد. بین تیمارهای هیپوکلریت‌سدیم اعمال شده، در هر دو شاخص درصد آلودگی و استقرار، اختلاف‌معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد که نشان دهنده‌ی مؤثّربودن هیپوکلریت‌سدیم بر آن شاخص‌ها است. علی‌رغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین اثرات متقابل تیمارهای اتانول و هیپوکلریت سدیم، پس از گذشت ۱۴ روز، بیش‌ترین میزان آلودگی در تیمار شاهد (صفر) و تیمارهای فاقد الکل وکم‌ترین آلودگی در تیمارهای اتانول ۷۰ و ۸۵٪ به‌همراه هیپوکلریت‌سدیم۱۰ و ۱۵٪ مشاهده‌شد. غلظت بهینه ضد باکتریایی اتانول ۶۰ تا ۹۰٪ حجمی است، زمانی‌که کمتر از ۵۰٪ رقیق شود فعّالیّت و اثر بیشتری دارد. کاربرد الکل ۸۵ ٪ گرچه از میزان ظهور آلودگی می‌کاهد ولی باعث ایجاد اثرات فنولیکی در ۲ سر ریزنمونه و شیشه‌ای شدن نوساقه‌ها می‌شود. کم‌ترین درصد استقرار و بیش‌ترین آلودگی پس از شاهد مربوط به تیمار هیپوکلریت‌سدیم ۵٪ است (شکل ۱). اختلاف‌معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۰ و ۱۵٪ هیپوکلریت‌سدیم وجود ندارد. هیپوکلریت

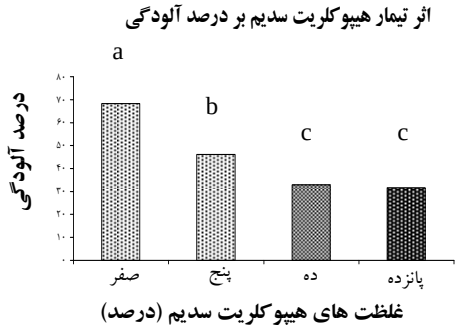
سدیم در غلظت‌های زیاد و زمان‌های طولانی، با افزایش ترشحات فنلی از قاعده نمونه‌ها، در قهوه‌ای شدن و مرگ بافت جوانه مؤثر است. میزان آلودگی قارچی بیش‌تر از آلودگی باکتریایی بود. میزان فعّالیّت قارچ به نسبت زیادتر از میزان فعّالیّت باکتری است (۲). در تیمارهایی که فقط آلودگی مخمر داشتند (۸)، میزان استقرار ریزنمونه نسبت به میزان آلودگی افزایش داشت (۳)، زیرا مخمرها باعث تولید ویتامین B در اطراف ریزنمونه می‌شوند (۴). در صورتی‌که ریزنمونه غیر از آلودگی مخمری، آلودگی دیگری داشت، به‌دلیل سرعت بیش‌تر رشد قارچ و باکتری نسبت به مخمر، رشد ریزنمونه متوقف می‌شد. در کشت‌ها قارچ ناشناسی (شبیه به خصوصیات جنس *Alternaria* sp.) یافت شد. قارچ‌های *Rhizopus* sp.، *Rizoctonia* sp. و *Penicillium* sp. نیز شناسایی شدند. با توجه به میزان پراکندگی عفونت‌ها، غیر از غلظت مواد ضدعفونی‌کننده عامل دیگری برگندزدایی ریزنمونه‌ها تأثیرگذار می‌باشد که به احتمال زیاد، مدّت زمان اعمال تیمارهای الکل و هیپوکلریت‌سدیم است، لذا پیشنهاد می‌شود؛ جهت ضدعفونی قطعات گره‌دار نسترن وحشی، از اتانول ۷۰٪ در مدّت زمان ۱دقیقه و هیپوکلریت‌سدیم ۱۰٪ به‌مدّت ۱۵دقیقه استفاده‌شود.

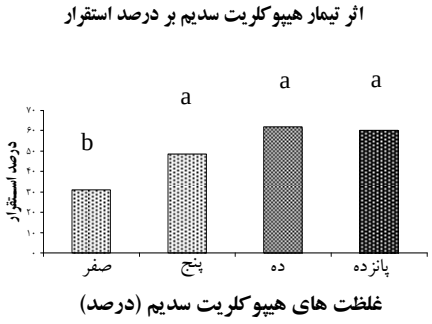
جدول (۱): نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای اتانول و هیپوکلریت‌سدیم بر درصد آلودگی و استقرار قطعات گره‌دار نسترن

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد آلودگی	درصد استقرار
اتانول (A)	۳	۱۱۹۶/۸۶**	۶۵۷/۱۱n.s
هیپوکلریت‌سدیم (B)	۳	۴۶۵۴/۴۹**	۳۲۶۳/۷۷**
A×B	۹	۲۰۶/۸۸n.s	۳۹۱/۲۱n.s
خطا	۴۸	۱۲۲/۷۸	۴۲۶/۱۲

n.s: فاقد اختلاف معنی دار، ** اختلاف معنی دار در سطح یک درصد







شکل(۱)، (بالا، چپ)- اثر غلظت‌های مختلف اتانول و (پایین، راست)- هیپوکلریت سدیم بر میزان درصد آلودگی و (پایین، چپ)- هیپوکلریت‌سدیم بر میزان درصد استقرار قطعات گره‌دار ساقه فرعی نسترن وحشی

* حروف غیر یکسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است.

منابع

۱) افشاری‌پور، س. ۱۳۷۲. مبانی کشت بافت گیاهی. انتشارات علوم پزشکی اصفهان.

۲) خوشخوی، م. ۱۳۸۴. گیاه‌افزایی (ازدیاد نباتات) مبانی و روش‌ها. چاپ ششم. مرکز نشر دانشگاه شیراز.

۳) رحیمی، م.، و. روحی، ع. محمدخانی و ع. فدایی تهرانی. ۱۳۹۱. بررسی اثر غلظت‌های مختلف اتانول و هیپوکلریت سدیم بر آغاز فعّالیّت جوانه‌های جانبی شاخه‌ی فرعی نسترن وحشی در شرایط درون‌شیشه. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، ۱۳تا۱۵ شهریورماه، دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه ۲۳۰.

۴) طباطبایی، س. ب.، م. امیدی. ۱۳۹۰. کشت بافت و سلول گیاهی، مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

۵) قاسمی قهساره، م. و م. کافی. ۱۳۸۸. گلکاری علمی و عملی (جلد اول). چاپ چهارم. انتشارات مؤلف. اصفهان.

۶) ولی‌زاده، م.، ع. رضایی و ب. یزدی‌صمدی. ۱۳۷۹. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی. دانشگاه تهران.

7) Esitken, A., Sezal, E., 2001. The effects of some hormones on the callus induction in *Rosa canina* and *Rosa dumalis* in vitro. Ataturk Univ. Ziraal Fak. Derg. 32(2): 125-128.
8) Glushakova, A. M., Chernov I. Y. U. 2009. Yeast communities dynamics in fruits of Hedge rose (Rosa canina). Mikologia I fitopatoligia (Mycology and Phytopathology) in Russian. 43: 193-199.
9) Eduardo, S. W. C. Peter Seemann F. Nancy Andrade S.and Magaly Rivero G., 2008, Establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Rosa canina* L. Universidad Austral de Chile Escuela de Agronomía.77pp.
10) Ho-Hyuk, J., Sung-Ho, A., Myung-Deok, K., Chan-Wha, K., 2008. "Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to Actinobacillus ureae". Process Biochemistry. 43: 225-228.
11) Larson, L., Morton, H., 1991. Chapter 11 "Disinfection, Sterilization and Preservation" Alcohols, 4th. E.
12) Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., Ahuja, P. S., 2005. In vitro propagation of rose-a review. Biotechnology Advances. 95-111.
13) Rout, G. R., Samantaray, S., Mottiey, J., Das, P., 1999. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. Scientia Horticulturae. 81: 201-228.
14) Shirdel, M., Motallebi-Azar, A., Masiha, S., Mortazavi, N., Matloobi, M., and Sharafi, Y., 2011. Effects inorganic nitrogen source and NH_4^+: NO_3^- ratio on proliferation of dog rose (*Rosa canina*). Journal of Medicinal Plants Research. 5(18): 4605-4609.
15) Shirdel, M., Motallebi-Azar, A., Matloobi, M., and Zaare-Nahandi, F., 2013. Effects of Nodal Position and growth Regulators on In Vitro Growth of Dog Rose (*Rosa canina*). Journal of Ornamental and Horticultural Plants, 3(1): 9-17.
16) Smaranda, V., 2011. In vitro multiplication of *Rosa canina* L. Biology vegetative. 11: 19-21.
17) Wyman, C. E., 1999. sterilization of fermentation vessels by ethanol/water mixtures. www.tpub.com.

Comparison of in vitro antimicrobial effect of ethanol and sodium hypochlorite on nodals of lateral shoots *(Rosa canina* L.)

M. Rahimi[1*], V. Rouhi[2], A. Mohammad-Khani[2], A. fadaei-Tehrani[3] and H. Kabiri[4]

1 M. Sc Student & 2- Assistant Professor Dept. of Horticultural Sciences, Shahrekord University, Shahrekord- Iran. 3- Assistant Professor & 4-Lab Assistant Dept. of Plant Protection Sciences, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

*Corresponding author

Abstract

Dog rose (*Rosa canina* L.), is a medicinal plant and one of the rootstocks for rose. Due to problems with propagation by seed and cutting methods and internal infection of explants at in vitro culture, a research was conducted on tissue culture methods for rapid propagation by determining the best method of sterilization for node branches of the dog rose. A factorial experiment was conducted based on completely randomized design with four replicates. The treatment included ethanol (0, 55, 70 and 85% at 20 seconds) and sodium hypochlorite (0, 5, 10 and 15 % at 10 minutes). Explants after treatments put horizontally on MS medium without growth regulators. The highest infection of explants obtained in control and all treatment without alcohol treatments after 14 days. The minimum infection observed in 70 and 85% of ethanol with 10 and 15% of sodium hypochlorite. However, alcohol 85 % treatment reduced the amount of infection, but caused phenolic effects of , explant and ne shoots vitrification. Fungi infection observed more than bacterial infection. Unidentified fungus (similar to the characteristics of *Alternaria sp.*) were found. The others fungus were also identified including *Rhizopus* sp., *Rizoctonia* sp. and *Penicillium* sp.. Explants was more stable in treatment with yeast infection. In this experiment the best treatment was observed at 70% ethanol to for 1 min with %10 sodium hypochlorite for 15 minutes.

Keywords: *Rosa canina* L, ethanol, sodium hypochlorite ,fungus