

ارزیابی اثر نانوذرات نقره و مواد ضدعفونی کننده شیمیایی بر کاهش آلودگی و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر القای کالوس در گیاه آنتوریوم (*Anthurium andreaeanum* Lindl.)

مریم رحمتی^۱، مریم دهستانی اردکانی^{۱*}، کاظم کمالی علی آباد^۳ و اعظم جعفری^۱

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

^۲ پژوهشکده گیاهان دارویی و صنعتی، اردکان، ایران، ^۳ گروه علوم خاک، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۰۶/۰۴)

چکیده

در پژوهش حاضر، در قالب دو آزمایش جداگانه ریزازدیادی گیاه آنتوریوم (*Anthurium andraeanum* Lindl.) مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول تأثیر انواع مواد ضدعفونی کننده شیمیایی بر کاهش آلودگی ریزنمونه های برگ و جوانه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد آزمون قرار گرفت. فاکتور اول شامل شش روش مختلف ضدعفونی (S1، S2، S3، S4، S5 و S6)، فاکتور دوم دو نوع ریزنمونه (برگ و جوانه) و فاکتور سوم شامل دو رقم آنتوریوم (قرمز و لب ماتیکی) بود. نتایج نشان داد که کم ترین میزان آلودگی (صفر درصد) در تیمار S6 (نانوذرات نقره) رقم قرمز و ریزنمونه برگ، تیمار S2 و S6 در رقم لب ماتیکی و ریزنمونه برگ و همچنین در تیمار S1 در ریزنمونه جوانه همین رقم حاصل شد. در آزمایش دوم اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر القای کالوس در ریزنمونه های برگ رقم "لب ماتیکی" به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد که فاکتور اول شامل ۱۱ تیمار (T1، T2، T3، T4، T5، T6، T7، T8، T9، T10 و T11) و فاکتور دوم شامل دو نوع محیط کشت (MS و ½ MS) بود. بیش ترین کالوس زایی در تیمار T3 (دو میلی گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + پنج درصد شیر نارگیل) به میزان ۴۰/۰۰ درصد صورت گرفت. جهت باززایی، کالوس ها به محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA انتقال داده شدند. به طور کلی استفاده از ترکیباتی مانند نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک تأثیر مثبتی در کاهش آلودگی ریزنمونه ها نشان داد و نیز ترکیبی از BA و 2,4-D در القای کالوس در ریزنمونه های برگ مؤثر شناخته شد.

واژه های کلیدی: آلودگی، آنتی بیوتیک، کالوس، محیط کشت، نانوذرات نقره

مقدمه

جذاب و ماندگار آن به فروش می رسد (Teixeira da Silva et al., 2015). تکثیر از طریق بذر در آنتوریوم منجر به هتروزیگوسیتی بالا می شود که تفرقه ژنتیکی را به همراه دارد و بر کیفیت، عملکرد و زمان گلدهی اولیه در کشت های تجاری تأثیر می گذارد (Jahan et al., 2010). علاوه بر این، بذرها دارای

گل کاری شاخه ای از باغبانی زینتی است که پتانسیل تولیدی بالایی در واحد سطح دارد (Wani et al., 2018). *A. andraeanum* یک گیاه زینتی با ارزش در سطح جهانی است که به عنوان گل شاخه بریده یا گیاه گلدانی به دلیل گل آذین های

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: mdehestani@ardakan.ac.ir

گیاهان کشت بافتی که به وسیله باکتری‌های درون‌زاد آلوده شده‌اند، به کار نمی‌روند مگر اینکه حذف آلودگی به روش‌های دیگر دشوار باشد. تلاش‌های زیادی برای سرکوب یا حذف باکتری‌های درون‌زاد از کشت‌ها با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با درجات مختلفی از موفقیت انجام شده است، هر چند گاهی با مشکلات سمیت گیاهی (Phytotoxic) مواجه بوده‌اند. در پژوهشی ضدعفونی ریزنمونه‌های نوک شاخساره آنتوریوم به صورت ترکیبی در محلول‌های آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، کلرید جیوه و اتانول بیشترین اثر را در کاهش آلودگی نشان داد (Mendi et al., 2024).

تا به امروز، نانوذرات نقره به عنوان ضدعفونی‌کننده برای محیط‌های کشت درون‌شیشه‌ای (Tung et al., 2022)، ضدعفونی ریزنمونه‌های برون‌شیشه‌ای *Kappaphycus striatus* (Mo et al., 2020)، گل داوودی (*Chrysanthemum*) (Tung et al., 2022)، یا اضافه‌شدن به محیط‌کشت برای افزایش رشد درون‌شیشه‌ای *Fragaria* × *ananassa* (Tung Bao et al., 2021)، *Panax vietnamensis* (Manh Cuong et al., 2021)، محدودکردن میکروارگانیسم‌ها در سیستم میکروپونیک (یک سیستم هیدروپونیک که در آن گیاهان کشت‌بافتی، کشت می‌شوند) (Tung et al., 2018) و غیره استفاده شده است. با این حال، تأثیرات نانوذرات نقره بر رشد و توسعه، غلبه بر پدیده‌های غیرعادی، بهبود ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای، افزایش نرخ بقا، بهبود سیستم کشت و غیره در برخی گیاهان نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

توانایی و ظرفیت بافت‌ها و اندام‌های مختلف گیاهی برای باززایی متفاوت است. بنابراین نوع، اندازه، سن، موقعیت و جهت ریزنمونه‌هایی که در کشت‌بافت گیاهی و در مرحله تکثیر (مرحله II) ریزازدیادی استفاده می‌شود، همگی از اهمیت بالایی برخوردارند (Pinheiro et al., 2013, 2014). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که ژنوتیپ آنتوریوم تأثیر قابل توجهی بر القای کالوس دارد (Cardoso, 2019; Jia et al., 2007; Jiang et al., 2006; Liu et al., 2009). (۲۰۰۶) دریافتند که سطح القای کالوس و قهوه‌ای‌شدن

عمر مفید کوتاه (۳-۲ روز پس از برداشت) و نرخ جوانه‌زنی پایینی (۲۰-۳۰ درصد) دارند (Jahan et al., 2010). از سوی دیگر، تکثیر غیرجنسی آنتوریوم از طریق شاخه‌ها یا ساقه‌ها به دلیل رشد رویشی کند این گونه، زمان‌بر است (Cardoso and Habermann, 2014). به همین دلایل، توسعه یک روش تکثیر کلونی برای تولید تعداد بالایی از ریزنمونه‌های تجاری در مدت زمان کوتاه ضروری است (Cardoso and Habermann, 2014; Teixeira da Silva et al., 2015). ریزازدیادی یک روش مناسب برای تکثیر آنتوریوم است و همچنین یک روش سریع برای کاربرد در مکان‌های کوچک برای تولید گیاهان عاری از پاتوژن است (Martinez-Estrada et al., 2016; Teixeira da Silva et al., 2015).

اجرای هر تکنیک کشت‌بافت گیاهی نیازمند مرحله پیش‌نیاز ضدعفونی ریزنمونه‌ها است. آلودگی هنوز یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها در کشت‌بافت گیاهی است (Oyebanji et al., 2009)، بنابراین موفقیت در کشت‌بافت به توسعه یک روش ضدعفونی مناسب برای کشت‌های عاری از میکروب بستگی دارد. میکروب‌ها می‌توانند در ریزنمونه گیاهی به صورت درون‌زاد باشند، یا آلودگی‌هایی هستند که به دلیل شرایط غیربهداشتی آزمایشگاه و مدیریت غیراستریل به وجود آمده‌اند (Oyebanji et al., 2009). این میکروب‌ها با بافت‌های گیاهی برای مواد مغذی در محیط‌کشت رقابت می‌کنند و حضور آن‌ها منجر به از دست‌رفتن کشت‌ها می‌شود یا می‌تواند باعث نکروز بافت و رشد ضعیف شود (Kane, 2003). چنین میکروب‌هایی می‌توانند با استفاده از عوامل مختلف ضدعفونی‌کننده مانند پراکسید هیدروژن، هیپوکلریت سدیم، الکل، کلرید جیوه، انواع آنتی‌بیوتیک و ترکیبات نقره که به عنوان روش‌های شیمیایی برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها استفاده می‌شوند، از بین بروند (Ahmed et al., 2022; Tung et al., 2021b). این ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی اثرات مضر متفاوتی دارند، زیرا برای بافت‌های گیاهی سمی هستند و البته این بستگی به ماهیت ماده ضدعفونی‌کننده و نوع ریزنمونه دارد (Bharti et al., 2018). آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور معمول در درمان

ریزنمونه‌ها در میان انواع مختلف آنتوریوم به‌طور قابل توجهی متفاوت است و نشان‌دهنده یک همبستگی منفی قابل توجه است (Jiang et al., 2006). بنابراین تشکیل کالوس می‌تواند با کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها افزایش یابد. در پژوهشی ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ، اسپات، اسپادیکس و جوانه آنتوریوم برای تکثیر از طریق اندام‌زایی غیرمستقیم در محیط کشت $MS \frac{1}{2}$ (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر ۶- بنزیل آمینوپورین (BA) + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر ۲ و ۴- دی کلروفونوکسی استیک اسید (2,4-D) مورد استفاده قرار گرفتند (Zhou et al., 2012). زمان ایجاد کالوس با ژنوتیپ‌های مختلف آنتوریوم متفاوت بود. در ابتدا، تشکیل کالوس بر روی ریزنمونه‌های برگ سه هفته پس از کشت در محیط کشت $MS \frac{1}{2}$ حاوی ۲/۱۶ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد (Yu YiXun et al., 2009). تشکیل کالوس ۶۰ روز پس از کشت ریزنمونه‌های برگ 'A. andraeanum' 'Terra' در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA + ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد (Farsi et al., 2012). در پژوهشی، فرآیند تکثیر از طریق القای کالوس از برگ‌های درون‌شیشه‌ای *A. andraeanum* 'Tropical' و باززایی شاخه از طریق تشکیل ساختارهای شبه پروتوکورم بررسی شد. تعداد ساختارهای شبه پروتوکورم در محیط کشت MS با افزودن کیتین و تیدیاوزون متفاوت بود. در محیط کشت MS که تنها از BA و 2,4-D استفاده شده بود، هیچ ساختار شبه پروتوکورمی مشاهده نشد و تمایل به افزایش تکثیر کالوس و وزن تازه کمتری وجود داشت و در محیطی که با کیتین غنی‌سازی شده بود، پروتوکورم‌های بیشتری به دست آمد و به بالاترین تعداد رسیدند (Tung et al., 2022). همچنین در پژوهشی جهت القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ *A. andraeanum* 'Pink Champion' از محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) استفاده شد (Zhang et al., 2025).

علی‌رغم بهینه‌سازی کشت‌بافت گیاه آنتوریوم، همچنان مسئله ضدعفونی و رفع آلودگی از ریزنمونه‌ها یکی از

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف بررسی تیمارهای مختلف جهت کاهش میزان آلودگی ریزنمونه‌ها و نیز تأثیر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی گیاه آنتوریوم (*A. andraeanum*) در شرایط درون شیشه‌ای و در آزمایشگاه کشت‌بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه اردکان یزد طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۳ انجام شد. گیاهان آنتوریوم مورد استفاده در این آزمایش از گلخانه تجاری واقع در شهرستان اصفهان تهیه شد. این پژوهش در قالب دو آزمایش صورت گرفت. در آزمایش اول اثر ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی بر کاهش آلودگی دو نوع ریزنمونه در دو رقم گیاه آنتوریوم مورد مطالعه قرار گرفت. در آزمایش دوم اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف بر القای کالوس در ریزنمونه برگ رقم لب ماتیکی بررسی شد.

در آزمایش اول اثر شش تیمار مختلف (S1, S2, S3, S4, S5 و S6)، در ضدعفونی، دو ریزنمونه برگ و جوانه دو رقم آنتوریوم (قرمز و لب ماتیکی) بررسی شد (جدول ۱). این آزمایش به‌صورت فاکتوریل (دو فاکتور تیمار ضدعفونی و ریزنمونه) در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت و پس از هشت هفته، درصد آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها ارزیابی و یادداشت شد. در این آزمایش فاکتورهای مورد مطالعه شامل نوع ریزنمونه (برگ و جوانه)، رقم (لب ماتیکی و قرمز) و تیمارهای ضدعفونی (شش تیمار) بودند. داده‌ها با ANOVA و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۳ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

لازم به ذکر است که در تمامی مراحل ظرف حاوی

جدول ۱- نوع و مدت زمان تیمارهای ضد عفونی ریزنمونه‌های برگ و جوانه دو رقم آنتوریوم

تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۴	مرحله ۵	مرحله ۶	مرحله ۷
S1	محلول پاشی شاخ و برگ گیاه گلدانی با محلول ۰/۰۵ در هزار آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به مدت ۱۰ روز قبل از کشت	شستن ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری	شستشو در محلول حاوی ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک + ۰/۱ درصد کلرید جیوه استریل به مدت ۳/۵ دقیقه	شست‌وشو با محلول اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد	اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۵ ثانیه	شست‌وشو با آب مقطر استریل	-
S2	اسپری گیاه گلدانی با قارچ‌کش کاربندازیم یک در هزار به مدت ۲ هفته قبل از کشت	شستن ریزنمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه زیر آب جاری	محلول قارچ‌کش کاربندازیم به مدت ۱۵ دقیقه	اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه	شست‌وشو با آب مقطر استریل	-
S3	شست‌وشو با آب مقطر استریل و اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد	کلرید جیوه ۰/۱ درصد با اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد به مدت ۴ دقیقه	شست‌وشو با اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد	شست‌وشو با آب مقطر استریل با اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد	نانو ذرات نقره ppm ۱۰۰۰ (Silvano co.) اندازه ذرات ۵-۸ میلی‌متر) + اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه	شست‌وشو با آب مقطر استریل و اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد	-
S4	محلول پاشی روی شاخ و برگ گیاه گلدانی با محلول ۰/۰۵ در هزار آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به مدت ۱۰ روز قبل از کشت	شست‌وشو ریزنمونه‌ها ابتدا با آب و مایع ظرفشویی	شست‌وشو با آب مقطر استریل و اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد به مدت ۳ دقیقه	محلول ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک + ۰/۱ درصد کلرید جیوه استریل به مدت ۴ دقیقه	شست‌وشو با اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد و سپس شست‌وشو در محلول آب مقطر استریل و اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد	غوطه‌ور در محلول نانو ذرات نقره ppm ۱۰۰۰ + اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه	۳ بار شست‌وشو با آب مقطر استریل به مدت ۳، ۱ و ۵ دقیقه
S5	غوطه‌ور در محلول نانو ذرات نقره ppm ۱۰۰۰ + اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد به مدت ۲۵ دقیقه	شست‌وشو با آب مقطر استریل و اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد به مدت ۳ دقیقه	شست‌وشو در محلول حاوی ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک + ۰/۱ درصد کلرید جیوه استریل به مدت ۷ دقیقه	شست‌وشو با اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد	شست‌وشو با آب مقطر استریل و اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد	سه بار شست‌وشو با آب مقطر استریل به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه	-
S6	شست‌وشو ریزنمونه‌ها ابتدا با آب و مایع ظرفشویی	غوطه‌ور در محلول نانو ذرات نقره ppm ۱۰۰۰ + اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد به مدت ۴۰ دقیقه	شست‌وشو با آب مقطر استریل و اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد	شست‌وشو در محلول حاوی ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک + ۰/۱ درصد کلرید جیوه استریل به مدت ۱۰ دقیقه	شست‌وشو با اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد	شست‌وشو با آب مقطر استریل و اسید آسکوربیک ۰/۰۵ درصد	اتانول ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه و سپس سه بار شست‌وشو با آب مقطر استریل

جدول ۲- ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGR) مورد استفاده در آزمایش دوم

تیمارها	ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی
T1	۲ میلی گرم بر لیتر BA + ۰/۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D
T2	۲ میلی گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D
T3	۲ میلی گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D + ۵٪ شیر نارگیل
T4	۱ میلی گرم بر لیتر BA + ۲ میلی گرم بر لیتر NAA
T5	۲ میلی گرم بر لیتر BA + ۲ میلی گرم بر لیتر NAA
T6	۲ میلی گرم بر لیتر BA + ۲ میلی گرم بر لیتر NAA + ۵٪ شیر نارگیل
T7	۱ میلی گرم بر لیتر BA + ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IAA
T8	۱ میلی گرم بر لیتر BA + ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA
T9	۵ میلی گرم بر لیتر BA + ۱ میلی گرم بر لیتر IAA
T10	۰/۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D + ۲۵۳ میلی گرم بر لیتر NH_4NO_3
T11	۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D + ۲۵۳ میلی گرم بر لیتر NH_4NO_3

ریزنمونه‌ها به خوبی تکان داده شد. بعد از اینکه نمونه‌ها آبگیری شدند با پنس استریل در زیر هود لامینار درون شیشه‌های مربایی با ارتفاع ۱۰ سانتی متر و قطر ۶ سانتی متر حاوی محیط کشت MS در ترکیب با ۳ درصد ساکارز و ۴ گرم در لیتر آگار آگار منتقل شدند. pH محیط کشت روی ۵/۶-۵/۷ تنظیم شد. درون هر شیشه سه ریزنمونه قرار گرفت. پس از کشت نمونه‌ها در اتاقک رشد با شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس در ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۰ درجه سلسیوس در دوره تاریکی و ۲۲ تا ۲۴ درجه سلسیوس در دوره روشنایی نگهداری شدند. پس از چهار هفته میزان آلودگی و درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها با چشم غیرمسلح ارزیابی شد.

در آزمایش دوم اثر نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ بررسی شد. در این آزمایش از دو محیط کشت MS و $\frac{1}{2}$ MS استفاده شد. همچنین اثر ۱۱ نوع ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ رقم لب ماتیکی بررسی شد (جدول ۲). لازم به ذکر است که ترکیب‌های انتخاب شده در این آزمایش بر اساس مطالعات قبلی صورت گرفت (Teixeira da Silva et al., 2015). پس از تهیه محیط کشت، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز

به آن اضافه و pH محیط کشت روی ۵/۶-۵/۷ تنظیم شد. سپس ۴ گرم در لیتر آگار آگار به آن اضافه گردید. سپس محیط کشت داخل شیشه‌های مربایی (با طول ۱۰ سانتی متر و قطر ۶ سانتی متر) توزیع شد. هر شیشه حاوی حدود ۳۰ میلی لیتر محیط کشت بود. پس از بستن درب ظروف درون اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۴ دقیقه استریل شدند. ریزنمونه‌ها به صورت جداگانه در شیشه‌های حاوی محیط کشت قرار گرفتند. در هر شیشه سه ریز نمونه کشت و در اتاقک رشد با شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس در ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۰ درجه سلسیوس در دوره تاریکی و ۲۲ تا ۲۴ درجه سلسیوس در دوره روشنایی نگهداری شدند.

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت و پس از شش هفته، درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها یادداشت شد. در این آزمایش فاکتورهای مورد مطالعه شامل کالوس‌زایی، رنگ کالوس و مدت زمان تا تشکیل کالوس (براساس هفته) بودند. تمامی داده‌ها از نظر نرمال بودن تست شده و تجزیه و تحلیل آن‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه

معنی‌دار بود اما اثر معنی‌داری بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها مشاهده نشد (جدول ۳).

با بررسی اثرات سه‌گانه تیمار، رقم و ریزنمونه مشخص شد که بیشترین میزان آلودگی (۱۰۰ درصد) در رقم قرمز، ریزنمونه برگ در تیمارهای S1، S2، S3، S5 و در ریزنمونه جوانه در تیمارهای S4، S5 و S6 و نیز در رقم لب ماتیکی در ریزنمونه برگ و تیمار S3 در ریزنمونه جوانه در تیمارهای S2 و S6 ایجاد شده است (شکل ۱). در بررسی اثرات سه‌گانه کمترین میزان آلودگی (صفر درصد) در رقم قرمز، ریزنمونه برگ و تیمار S6، در رقم لب ماتیکی در ریزنمونه برگ در تیمار S2 و S6، همچنین در ریزنمونه جوانه در تیمار S1 حاصل شد (شکل ۱a).

یکی از مراحل حیاتی کشت‌بافت، استقرار کشت در شرایط درون‌شیشه است. دو مشکل اصلی در این مرحله وجود دارد: انتخاب صحیح ریزنمونه‌ها و فرآیند ضدعفونی. در ضدعفونی سطحی باید اطمینان حاصل شود که نمونه‌های قرار داده شده در محیط درون‌شیشه از هر گونه آلودگی میکروبی عاری باشند. در پژوهش حاضر، شش تیمار مختلف جهت ضدعفونی ریزنمونه‌های گیاه آنتوریوم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در ریزنمونه‌های جوانه کاربرد تیمارهای S1 و S6 و در ریزنمونه‌های برگ تیمارهای S2 و S6، بهترین عملکرد را در کاهش آلودگی داشتند. این تیمارها حاوی ترکیبات آنتی‌بیوتیک و نانوذرات نقره بودند که وجه تمایز میان آن‌ها و سایر تیمارها است. یکی از مشکلات در تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه آنتوریوم، آلودگی ریزنمونه‌ها بوده که منجر به عدم موفقیت در کشت‌بافت آن می‌گردد. آلودگی میکروبی یکی از بزرگ‌ترین مشکلات در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان است که مستقیماً بر هزینه تولید و نگهداری ریزنمونه‌های ارزشمند تأثیر می‌گذارد. آلاینده‌های باکتریایی به‌ویژه مشکل‌ساز هستند، زیرا اغلب تنها پس از چند بار واکشت از کشت‌های به ظاهر تمیز ظاهر می‌شوند (Fang and Hsu, 2012). نتایج این پژوهش با Mendi و همکاران (۲۰۲۴) که ترکیب محلول‌های آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، کلرید جیوه و اتانول را برای

و تحلیل قرار گرفتند. اندازه‌گیری صفاتی مانند درصد کالوس-زایی، رنگ کالوس و زمان تا تشکیل کالوس با چشم غیرمسلح انجام پذیرفت. رنگ کالوس براساس مقیاس هدونیک ۵-۱ اندازه‌گیری شد. به‌طوریکه کالوس‌های با رنگ قهوه‌ای نمره ۱ و سبز پررنگ (تیره) نمره ۵ را به خود اختصاص دادند (Zamani et al., 2019).

چهار هفته پس از تشکیل کالوس (حدوداً ۱۰ هفته پس از کشت)، آن‌ها به محیط‌کشت باززایی MS شامل یک میلی‌گرم در لیتر 2.4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA انتقال داده شدند (این محیط براساس مطالعه منابع انتخاب شد) (Teixeira da Silva et al., 2015). پس از گذشت سه ماه پرآوری صورت گرفت. گیاهچه‌های به‌دست آمده جهت سازگاری به گلدان‌های با قطر دهانه ۷ سانتی‌متر حاوی ۵۰ درصد کوکوپیت و ۵۰ درصد پرلیت، منتقل شدند (شکل ۶). جهت سازگاری بهتر روی هر گلدان یک لیوان پلاستیکی شفاف قرار داده شد و پس از سازگاری کامل از روی گیاه برداشته شد و همه گیاهچه‌ها پس از انتقال به محیط بیرون از شیشه سازگاری نشان دادند.

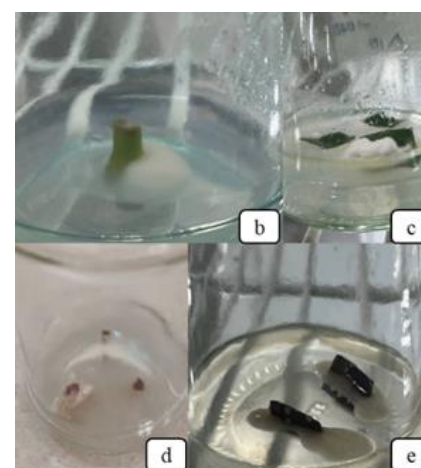
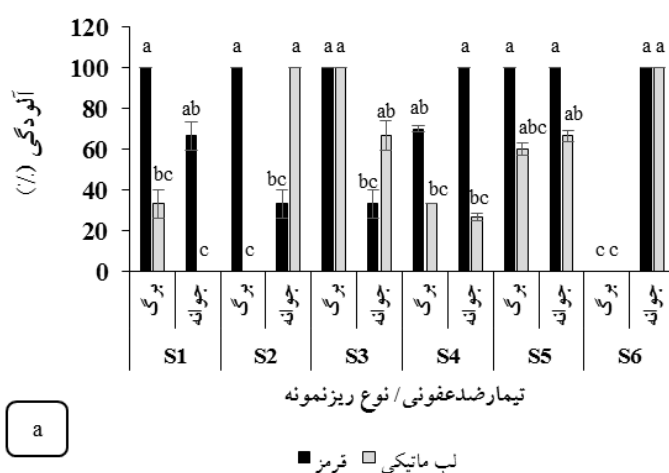
نتایج و بحث

آزمایش اول: براساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، اثر رقم بر میزان آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های گیاه آنتوریوم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. ریزنمونه‌ها اثر معنی‌داری بر میزان آلودگی و قهوه‌ای شدن نشان ندادند. اثر تیمار بر آلودگی معنی‌دار نبود اما در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌داری بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نشان داد. اثر متقابل رقم و ریزنمونه اختلاف معنی‌داری بر میزان هر دو صفت مورد مطالعه نشان نداد. اثر متقابل رقم و تیمار بر میزان آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل ریزنمونه و تیمار در سطح احتمال یک درصد بر میزان آلودگی معنی‌دار بود اما اثر معنی‌داری بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نشان نداد. اثر سه‌گانه رقم، ریزنمونه و تیمار بر میزان آلودگی ریزنمونه‌ها در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر رقم، ریزنمونه و تیمارهای مختلف ضد عفونی بر میانگین مربعات قهوه‌ای شدن و آلودگی در محیط کشت MS گیاه آنتوریوم (*A. andreaum*).

منابع تغییرات	df	میانگین مربعات	
		آلودگی	قهوه‌ای شدن
رقم (A)	۱	۱۲۵۳۴/۷۲**	۱۴۸۹۴/۳۸**
ریزنمونه (B)	۱	۱۱۶۸/۰۵ ^{ns}	۱۶۰۵/۵۵ ^{ns}
تیمار (C)	۵	۲۱۰۵/۸۳ ^{ns}	۳۰۱۹/۰۸*
A×B	۱	۳۶۱۲/۵۰ ^{ns}	۹۳۸/۸۸ ^{ns}
A×C	۵	۳۱۱۴/۷۲*	۱۸۲۹/۲۲*
B×C	۵	۸۱۸۵/۰۵**	۲۱۴۹/۷۲ ^{ns}
A×B×C	۵	۳۸۱۹/۱۶**	۱۷۲۴/۵۲ ^{ns}
خطا	۴۸	۱۰۱۰/۰۶	۱۱۷۵/۸۷
ضریب تغییرات (%)	-	۱۶/۱۰	۱۰/۹۰

* و ** به ترتیب نشان دهنده معناداری در سطوح ۵ و ۱٪ و ^{ns} نشان دهنده غیر معنادار بودن است.



شکل ۱- اثر سه گانه تیمار، رقم و ریزنمونه بر درصد آلودگی ریزنمونه‌های کشت شده در شرایط درون شیشه در گیاهان آنتوریوم (*Anthurium andreaum*) (a). نمونه‌هایی از آلودگی قارچی در ریزنمونه‌های (b) جوانه و (c) برگ و آلودگی باکتریایی در (d) ریزنمونه‌های جوانه و (e) برگ گیاهان آنتوریوم.

ضروری برای رشد و تکثیر خود را تولید کنند و در نتیجه می‌میرند (Surre et al., 2018).

مرحله ضد عفونی سطحی یکی از مراحل مهم در جلوگیری از شیوع آلودگی‌های قارچی و باکتریایی بر روی ریزنمونه‌ها، طی مراحل کشت بافت است. در این تحقیق آلودگی‌های سطحی بسیار شدیدی در ریز نمونه‌ها مشاهده شد، ولی کاربرد

ضد عفونی ریزنمونه‌های نوک شاخساره آنتوریوم مؤثر دانستند، (Mendi et al., 2024) مطابقت داشت. تتراسایکلین با جلوگیری از ترکیب پروتئین در باکتری‌ها عمل می‌کند. این آنتی‌بیوتیک به واحدی S ۳۰ ریبوزوم باکتری‌ها متصل می‌شود و باعث اختلال در فرآیند ترجمه (ترکیب پروتئین) می‌شود. این عمل باعث می‌شود که باکتری‌ها نتوانند پروتئین‌های

همزمان محلول کلرید جیوه و اسید سیتریک آلودگی‌های قارچی را به‌طور کامل از بین برد. با گذشت حدوداً چهار تا ده روز از کشت گیاهان، آلودگی باکتریایی در ریزنمونه‌ها مشاهده شد و گسترش یافت. بنابراین آلودگی باکتریایی، در این گیاهان از نوع آلودگی اندوفیت بوده است.

نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی قوی خود در برابر طیف گسترده‌ای از آلاینده‌ها، به عنوان یک عامل استریل‌کننده امیدوارکننده در کشت بافت گیاهی مطرح شده‌اند. مکانیسم اساسی که از طریق آن نانوذرات نقره اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند، شامل توانایی آنها در نفوذ به سلول‌های میکروبی و القای تغییرات ساختاری و عملکردی در اجزای درون سلولی از جمله اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها است که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (Park et al., 2021; Wang et al., 2017). این حالت عملکرد چند هدفی، ایجاد مقاومت را برای میکروارگانیسم‌ها دشوار می‌کند، زیرا برای غلبه بر اثرات ضد میکروبی، به جهش‌های ژنی همزمان متعددی نیاز است (Wang et al., 2017). نتایج ثبت شده در این مطالعه نشان می‌دهد که نانوذرات نقره به عنوان ضد عفونی‌کننده‌های بالقوه عمل کرده و می‌توانند جایگزین ضد عفونی‌کننده‌های رایج شوند. اثربخشی ضد میکروبی نانوذرات نقره (AgNPs) تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله اندازه، ابعاد و نوع خاص آن‌ها قرار دارد (Parzymies, 2021). به‌طور کلی، نانوذرات کوچک‌تر به دلیل نسبت سطح به حجم بیشتر و توانایی برتر در تعامل و نفوذ به سلول‌های میکروبی، اثرات ضد میکروبی بهتری نشان می‌دهند (Ahlawat et al., 2022). در مقایسه با عوامل استریل‌کننده سنتی، نانوذرات نقره سمیت کمتری از خود نشان می‌دهند و تحمل بافتی بهتری دارند، که آن‌ها را به ویژه برای ریزنمونه‌های حساس مناسب می‌سازد (Park et al., 2021). با این حال، توجه به این نکته مهم است که در حالی که نانوذرات نقره به‌طور کلی نسبت به استریل‌کننده‌های معمولی برای بافت‌های گیاهی کم‌ضررتر هستند، اثرات آن‌ها می‌تواند براساس گونه گیاهی و غلظت متفاوت باشد. در غلظت‌های

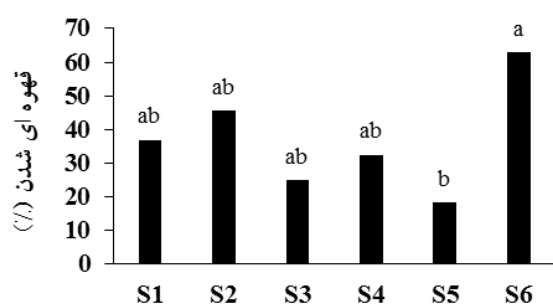
بالتر، آن‌ها ممکن است رشد و تکامل گیاه را مهار کرده و باعث آسیب بافتی و حتی مرگ شوند (Eisa et al., 2022). بنابراین، تعیین غلظت بهینه که اثربخشی ضد میکروبی را با زنده ماندن ریزنمونه متعادل کند، برای هر گونه گیاهی و نوع بافت خاص، حیاتی است. براساس این نتایج، مهار آلودگی بستگی به غلظت و زمان قرارگیری عامل روی نمونه‌ها کمترین میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها (۱۸/۳۳ درصد) در تیمار S5 و بیشترین میزان (۶۲/۹۱ درصد) در تیمار S6 حاصل شد (شکل ۲a). ریزنمونه‌ها در رقم قرمز نسبت به لب‌ماتیکی کمتر (۲۲/۵ درصد) قهوه‌ای شدند (شکل ۲b). در تیمار S5 از محلول نانوذرات نقره استفاده شده بود. در تیمارهای S1 و S4 نیز که به ترتیب ۳۶/۸۳ و ۲۵/۰۰ درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها مشاهده شد، از ترکیب تتراسایکلین استفاده شده بود. قهوه‌ای شدن در کشت بافت گیاهی را می‌توان به دو دسته اصلی تقسیم کرد: غیر آنزیمی و آنزیمی. قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی از طریق فرایندهایی مانند واکنش میلارد و پیرولیز قندها رخ می‌دهد و به‌طور کلی مانع جدی رشد طبیعی نمی‌شود. در مقابل، قهوه‌ای شدن آنزیمی که در کشت بافت گیاهی غالب است، یک چالش قابل توجه به شمار می‌رود. این نوع قهوه‌ای شدن شامل اکسیداسیون ترکیبات فنلی به ۰-کینون‌های ناپایدار توسط آنزیم‌هایی مانند پلی‌فنول اکسیداز (PPO)، پراکسیداز (POD) و ال-فنیل آلانین آمونیلاز (PAL) است (Ru et al., 2013). استفاده از اسید آسکوربیک می‌تواند نقش مهمی در کاهش تولید فنل و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشته باشد که با نتایج Hesami و همکاران (۲۰۱۷) در گیاه انجیر معابد (*Ficus religiosa*) مطابقت داشت (Hesami et al., 2017).

آزمایش دوم: براساس نتایج جدول تجزیه واریانس (۴) اثر محیط کشت در سطح احتمال یک درصد بر القای کالوس و زمان تا القای کالوس و در سطح احتمال پنج درصد بر رنگ کالوس معنی‌دار بود و در سایر صفات تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اثر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در سطح احتمال یک درصد بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها معنی‌دار شد و بر زمان تا القای کالوس در سطح احتمال پنج درصد

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر محیط کشت و تیمارهای مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی بر میانگین مربعات کالوس زایی در گیاه آنتوریوم (*A. andreaum*).

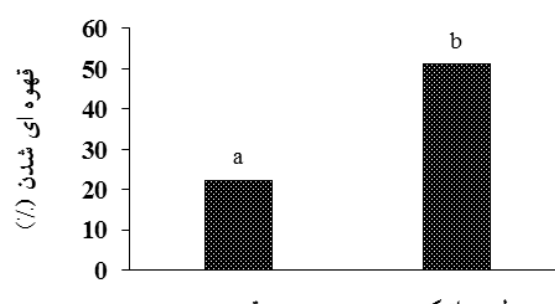
میانگین مربعات				df	منابع تغییرات
رنگ کالوس	قهوه ای شدن ریزنمونه ها	زمان تا القای کالوس	کالوس زایی		
۱۰/۲۴*	۳۷۸۷/۸۷ ^{ns}	۵۱۸/۶۵**	۶۱۲۸/۷۲**	۱	محیط کشت (A)
۳/۴۹ ^{ns}	۵۴۲۴/۲۴**	۱۱۲/۷۰*	۹۰۱/۳۸ ^{ns}	۱۰	تنظیم کننده های رشد گیاهی (B)
۷/۶۰**	۱۱۲۱/۲۱ ^{ns}	۱۳۶/۵۲**	۱۷۲۸/۷۲ ^{ns}	۱۰	A×B
۲/۱۵	۱۰۶۰/۶۰	۴۷/۱۲	۴۷۵/۶۹	۴۴	خطا
۳۰/۳	۲۸/۰	۳۳/۵۰	۱۳/۵۰	-	ضریب تغییرات (%)

* و ** به ترتیب نشان دهنده معناداری در سطوح ۵ و ۱٪ و ^{ns} نشان دهنده غیر معنادار بودن است.



a

تیمارهای ضد عفونی



b

رقم

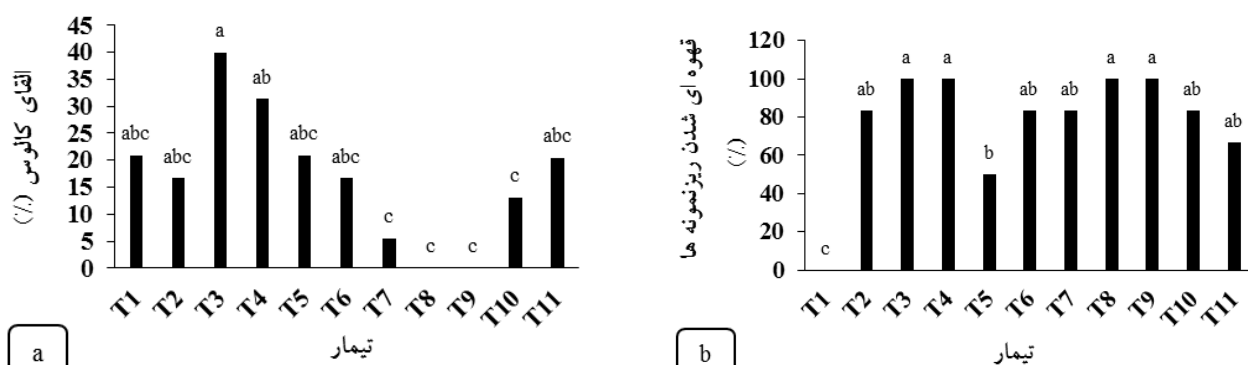
شکل ۲- اثر (a) تیمارهای ضد عفونی و (b) رقم بر درصد قهوه ای شدن ریزنمونه های کشت شده درون شیشه ای در گیاه آنتوریوم (*Anthurium andreaum*).

ریزنمونه ها قهوه ای شدند (شکل ۳b). در تیمار T1 نمونه ها هیچ گونه اثری از قهوه ای شدن نشان ندادند (صفر درصد) (شکل ۳b).

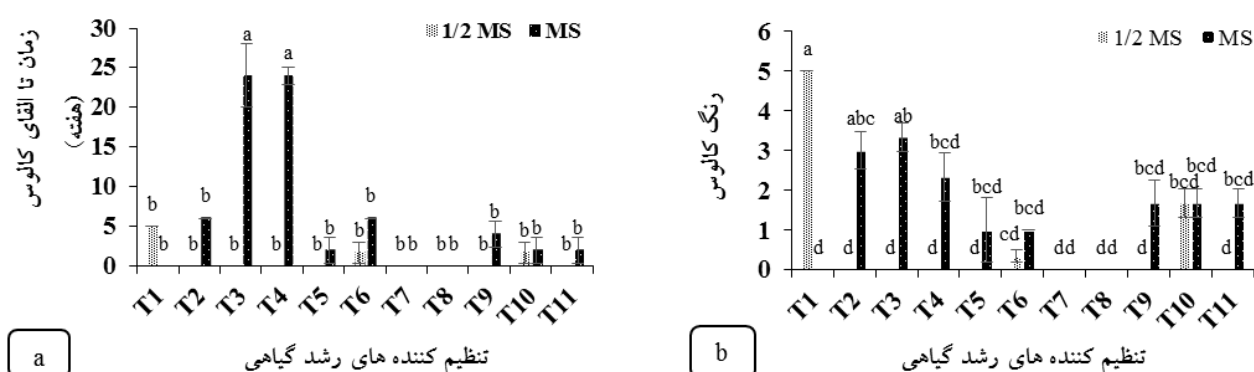
بیشترین مدت زمان تا تشکیل کالوس یعنی ۲۴ هفته در محیط کشت MS و تیمارهای T3 و T4 و کمترین زمان تشکیل تا کالوس در محیط کشت MS به ترتیب در تیمارهای T5 (دو هفته)، T10 (دو هفته)، T11 (دو هفته)، T9 (چهار هفته)، T2 (شش هفته) و T6 (شش هفته) بود. در ضمن در محیط کشت MS ۱/۲ در تیمارهای T2، T3، T4، T5، T7، T8، T9 و T11 و نیز در محیط کشت MS در تیمارهای T1، T7 و T8 هیچ گونه کالوسی تشکیل نشد (شکل ۴a) با بررسی رنگ کالوس ها مشخص شد که کالوس های با رنگ سبز (نمره ۵) در تیمار T1 و محیط کشت MS ۱/۲ تشکیل شده است (شکل ۴b و

معنی داری را نشان داد اما بر کالوس زایی و رنگ کالوس اثر معنی داری نشان نداد. اثر متقابل محیط کشت و تیمار تنظیم کننده های رشد گیاهی در سطح احتمال یک درصد بر رنگ کالوس ریزنمونه ها و زمان تا القای کالوس معنی دار شد اما بر سایر صفات مورد بررسی اثر معنی داری نشان نداد (جدول ۴).

بیشترین درصد تشکیل کالوس در تیمار T3 (۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + پنج درصد شیره نارگیل) به میزان ۴۰/۰۰ درصد حاصل شد و پس از آن به ترتیب تیمارهای T4 (۳۱/۳۳ درصد)، T1 (۲۰/۸۳ درصد)، T5 (۲۰/۸۳ درصد)، T11 (۲۰/۵۰ درصد)، T2 (۱۶/۶۷ درصد) و T6 (۱۶/۶۷ درصد) منجر به بیشترین میزان تشکیل کالوس شدند (شکل ۳a). در تیمارهای T3، T4، T8 و T9 ۱۰۰ درصد



شکل ۳- اثر تیمار بر (a) درصد القای کالوس و (b) قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای در گیاه آنتوریوم (*Anthurium andreaeanum*).

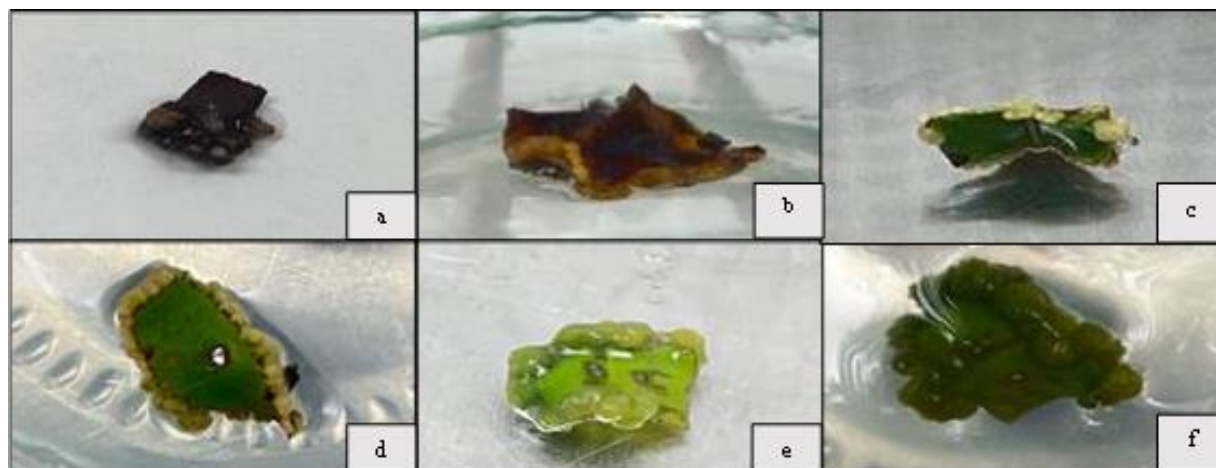


شکل ۴- اثر متقابل تیمار و محیط‌کشت بر (a) زمان تا القای کالوس و (b) رنگ کالوس در گیاه آنتوریوم (*Anthurium andreaeanum*).

گرفت. در پژوهشی از برگ، دمبرگ، اسپات و اسپادیکس آنتوریوم استفاده شد (Zhou et al., 2012). زمان ایجاد کالوس با ژنوتیپ‌های مختلف آنتوریوم متفاوت بود. تشکیل کالوس ۶۰ روز پس از کشت ریزنمونه‌های '*A. andreaeanum* 'Terra' مشاهده شد (Farsi et al., 2012). در مطالعه حاضر، تشکیل کالوس پس از حدود حداقل ۲ تا ۲۴ هفته از کشت مشاهده شد. هنگامی که کالوس‌ها به محیط‌کشت پرآوری منتقل شدند و به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند، ساقه و برگ اضافی تشکیل شد. سپس، گیاهچه‌ها به مدت یک هفته سازگار شدند. گیاهچه‌ها جهت سازگاری به گلدان‌های حاوی ۵۰ درصد کوکوپیت و ۵۰ درصد پرلایت که پس از آماده‌سازی اولیه بستر کشت، با آب‌مقطر کمی مرطوب شده بود و همزمان با قارچ‌کش بنومیل (۱/۵ گرم در لیتر) خیس‌انده شده بود، منتقل شدند. بستر کشت درون گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه هفت سانتی‌متر ریخته و برای انتقال گیاهچه‌ها به درون آنها

شکل ۵F). این کالوس دارای بافت سفت و منسجمی بود. همچنین در محیط‌کشت ۱/۲ MS در تیمار T6 کالوس‌های قهوه‌ای رنگ با بافت غیرمترک تشکیل شد (شکل ۵A)، در محیط‌کشت MS در تیمارهای T4، T5، T6، T9، T10 و T11 کالوس‌های زرد (سفید و شیری) رنگ با بافت نسبتاً مترک تشکیل شد (شکل ۵D)، در تیمارهای T2 و T3 در محیط‌کشت MS کالوس‌های به رنگ سبز کم‌رنگ و بافت غیرمنسجم تشکیل شد (شکل ۵E).

ایجاد کالوس برای دستیابی به افزایش میزان ریزازدیادی بسیار حیاتی است. در مطالعات ریزازدیادی گیاه آنتوریوم، موفقیت پروتکل‌ها به نوع رقم، نوع ریزنمونه و اجزای محیط‌کشت مورد استفاده برای تجدد ساقه و ریشه وابسته است (Budiarto, 2010). عموماً ریزنمونه‌های برگ برای تکثیر از طریق اندام‌زایی غیرمستقیم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Farsi et al., 2012) که در این آزمایش نیز همین کار صورت



شکل ۵- رنگ‌های مختلف کالوس‌های القایی (a) تشکیل کالوس در ریزنمونه برگ قهوه‌ای در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر ۲ + BA (b) کالوس زرد و قهوه‌ای در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر ۲ + BA (c) کالوس زرد روشن در محیط کشت MS + ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D (d) کالوس زرد در محیط کشت MS + ۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D (e) کالوس سبز و زرد در محیط کشت MS + ۱/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D (f) کالوس سبز در محیط کشت MS + ۱/۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D

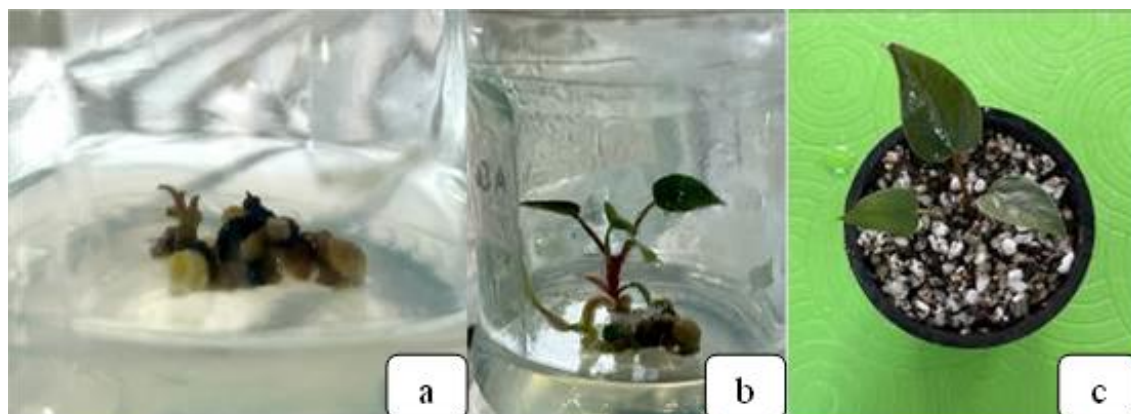
برخی تحقیقات مشخص شد که هورمون‌های گیاهی به تنهایی مانند BA، Kin و 2,4-D قادر به القای کالوس نبودند و ترکیبی از اکسین‌ها و سیتوکین‌ها برای القای کالوس از بافت برگ ضروری بود (Wu, 2010) که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. با کشت ریزنمونه‌های برگ *A. andraeanum* کالوس با افزایش غلظت BA از ۱ به ۲/۰ میلی گرم در لیتر بهبود یافت (Gao YueRong et al., 2013) که با نتایج این پژوهش مطابقت نشان داد و با افزایش مقدار BA به ۲ میلی گرم در لیتر کالوس‌زایی بیشتری صورت گرفت. نسبت اکسین (2,4-D) و سیتوکینین (BA) از تأثیر تکی هر یک برای القای کالوس در '*A. andraeanum* YNG5' مهم‌تر گزارش شد و ترکیب ۰/۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم در لیتر BA مناسب‌ترین بود که با یافته‌های این پژوهش مطابقت نشان داد (Zhou et al., 2012). کاربرد BA در مقایسه با کاربرد کایتین در محیط کشت گیاه *Haworthia cooperi* و نیز ژربرا بر پارامترهای باززایی مؤثرتر بود (Kharrazi et al., 2018, 2022).

در این پژوهش با وجود استفاده از نسبت‌های هورمونی متنوع برای کشت بافت با مشاهده و بررسی نمونه‌های کشت

آماده شدند. جهت سازگاری بهتر روی هر گلدان یک لیوان پلاستیکی شفاف قرار داده شد و پس از سازگاری کامل از روی گیاه برداشته شد.

سطح القای کالوس و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در میان انواع مختلف آن‌توریوم به‌طور قابل توجهی متفاوت است و نشان‌دهنده یک همبستگی منفی قابل توجه بین این دو پارامتر است (Jiang et al., 2006). بنابراین تشکیل کالوس می‌تواند با کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها افزایش یابد.

موفقیت کالوس و اندام‌زایی در مطالعات درون‌شیشه‌ای آن‌توریوم به انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (PGR) و افزودنی‌های محیط کشت بستگی دارد. دامنه وسیعی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، از جمله BA، 2,4-D، TDZ، زآتین، کیتین (Kin)، NAA، اسید ایندول-۳-بوتیریک (IBA)، اسید ایندول-۳-استیک (IAA) و غیره، به‌صورت تنها یا ترکیبی برای تکثیر درون‌شیشه‌ای آن‌توریوم استفاده شده است. مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی یا ترکیبات آن‌ها برای وارپته‌های مختلف، ریزنمونه‌ها یا مراحل کشت متفاوت بود، که عمدتاً شامل القای کالوس، تمایز و تکثیر جوانه، تشکیل ریشه و سایر فرآیندهای اندام‌زایی می‌شود. در



شکل ۶- مراحل مختلف ریزازدیادی گیاه آنتوریوم (a) القای کالوس در ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BA + ۲ میلی گرم بر لیتر NAA + ۰.۵٪ شیر نارگیل، (b) باززایی کالوس‌ها و تشکیل برگ و شاخساره و ریشه در محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم در لیتر 2.4-D + ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA و (c) انتقال گیاهان ریشه‌دار به گلدان حاوی ۵۰ درصد پرلیت + ۵۰ درصد کوکوپیت

کالزایی در هر دو محیط کشت از ابتدای هفته دوم کشت آغاز شد، اما در عین حال در طول مدت یکسان آزمایش، محیط کشت MS حجم بیشتری کالوس نسبت به محیط کشت MS ۱/۲ داشت. در این پژوهش یکی از ترکیباتی که در القای کالوس مؤثر بود، شیر نارگیل بود. مطالعه حاضر نشان داد که شیر نارگیل یکی از مواد مؤثر در القای توده کالوس بود که این امر می‌تواند به دلیل غلظت‌های بالای گلوکز و فروکتوز، همچنین مواد معدنی، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب مختلف باشد (Ebrahimzadeh et al., 2023). همچنین شیر نارگیل حاوی دی‌فنل اوره (که به عنوان سیتوکینین عمل می‌کند) است و می‌تواند با القای تقسیم سلولی گیاهی، رشد را تسریع کند. همچنین مشخص شد که ۱۰٪ آب نارگیل در تولید کالوس بیشتر در *Phalaenopsis violacea* مؤثرترین است (Pavallekoodi Gnasekaran et al., 2010). نتایج به دست آمده با Ebrahimzadeh و همکاران (۲۰۲۳) روی *Silybum marianum* L. نیز مطابقت داشت. آنها گزارش کردند که افزودن شیر نارگیل به محیط کشت حاوی ترکیب BAP و NAA موجب افزایش القای کالوس شد. 2.4-D به میزان بیشتری از یک اکسین سنتزی دیگر، یعنی NAA، باعث تکثیر سلول‌ها می‌شود. در پژوهشی ترکیب 2.4-D و BAP در القای کالوس در گیاه *Vaccinium corymbosum* بسیار مؤثر اعلام

شده هیچ گونه اندام‌زایی در برخی بافت‌های کالوسی مشاهده نشد که علت آن ممکن است استفاده از 2.4-D باشد. زیرا گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر اینکه استفاده از این هورمون سبب توقف اندام‌زایی و تمایز یابی بافت‌ها می‌شود و کالزایی را تسریع می‌کند (Rahmati et al., 2017). با اینکه کشت ریزنمونه‌های اولیه به کار رفته در تحقیق همزمان انجام گرفت، ویژگی‌های کیفی از جمله بافت و رنگ کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت‌ها متفاوت بود. کالوس‌ها در محیط کشت تیمار T1 (۲ میلی گرم در لیتر BA + ۰.۲ میلی گرم در لیتر 2.4-D) و محیط کشت MS ۱/۲ به رنگ سبز تیره بودند، در صورتی که در محیط کشت MS تیمارهای T4، T5، T6، T9، T10 و T11 کالوس‌های زرد (سفید و شیری) داشتند. کالوس‌های محیط کشت MS ۱/۲ در تیمار T6 (۲ میلی گرم در لیتر BA + ۲ میلی گرم در لیتر NAA + پنج درصد شیر نارگیل) بافتی شل داشتند و رنگشان قهوه‌ای تیره مایل به سیاه بود (شکل ۶A). از آنجا که کیفیت کالوس به نوع و مقدار عناصر موجود در محیط کشت (ماکرو و میکرو ویتامین‌ها و غیره) وابسته است، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد می‌توانند بر این متغیر اثرگذار باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که نوع محیط کشت پایه یا به عبارت دیگر نوع و غلظت عناصر غذایی ممکن است بر میزان کالوس‌زایی اثر قابل توجهی داشته باشد.

شد (Rybin et al., 2024).

جهت باززایی با توجه به مطالعات صورت گرفته در منابع از محیط کشت شامل یک میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA + ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA استفاده شد (Teixeira da Silva et al., 2015). پس از باززایی، گیاهچه‌ها جهت سازگاری به گلدان‌های حاوی ۵۰ درصد کوکوپیت و ۵۰ درصد پرلیت منتقل شدند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، یک پروتکل مناسب جهت استریل‌سازی برگ و جوانه *Anthurium andreaeanum* با استفاده از آنتی‌بیوتیک، نانوذرات نقره و سایر عوامل استریل‌کننده شیمیایی معرفی شد. نانوذرات نقره به‌طور قابل‌توجهی درصد بقا و استریل‌سازی برگ و جوانه را نسبت به سایر تیمارها افزایش داد. هر چند

منابع

- Ahlawat, J., Sehwat, A. R., Choudhary, R., & Yadav, S. K. (2022). Biologically synthesized silver nanoparticles eclipse fungal and bacterial contamination in micropropagation of *Capparis decidua* (FORSK.) Edgew: A substitute to toxic substances. *Indian Journal of Experimental Biology (IJB)*, 58(05), 336-343.
- Ahmed, N., Mohamed, H. F., Xu, C., Lin, X., & Huang, L. (2022). A novel surface sterilization method using *Artemisia dracuncul* extract for tissue culturing of endangered species *Sargassum fusiforme*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-022-02239-y>
- Bharti, N., Kapoor, B., Shaunak, I., Sharma, P., & Sharma, R. (2018). Effect of sterilization treatments on in vitro culture establishment of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *IJCS*, 6(5), 1165-1168.
- Budiarto, K. (2010). Spectral quality affects morphogenesis on *Anthurium* plantlet during in vitro culture. *Agrivita Journal of Agricultural Science*, 32(3), 234-240.
- Cardoso, J. C. (2019). Silver nitrate enhances in vitro development and quality of shoots of *Anthurium andraeanum*. *Scientia Horticulturae*, 253, 358-363. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.054>
- Cardoso, J. C., & Habermann, G. (2014). Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andraeanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 55(1), 56-62. <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0022-9>
- Ebrahimzadeh, M. H., Naseri, M., Younesikelaki, F. S., & Javan, I. Y. (2023). Influence of plant growth regulators on callus induction, silymarin production and antioxidant activity in *Silybum marianum* L. Gaertn. by tissue culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 10(2), 223-236.
- Eisa, E. A., Tilly-Mándy, A., Honfi, P., Shala, A. Y., & Gururani, M. A. (2022). Chrysanthemum: A comprehensive review on recent developments on in vitro regeneration. *Biology*, 11(12), 1774. <https://doi.org/10.3390/biology11121774>
- Fang, J. Y., & Hsu, Y. R. (2012). Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 110, 53-62. doi.org/10.1007/s11240-012-0129-6
- Farsi, M., Taghavizadeh, Y. M., & Qasemimran, V. (2012). Micropropagation of *Anthurium andraeanum* cv. Terra. *African Journal of Biotechnology*, 11(68), 13162-13166. DOI:10.5897/AJB12.893
- Gao YueRong, G. Y., Niu JunHai, N. J., Yang GuangSui, Y. G., Huang SuRong, H. S., Chen JinHua, C. J., Leng QingYun, L. Q., & Yin JunMei, Y. J. (2013). Establishment of in vitro propagation system based on *Anthurium andraeanum* ('Fiesta'and'Altimo'). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133264409>

- Hesami, M., Daneshvar, M. H., & Lotfi-Jalalabadi, A. (2017). Activated charcoal, ascorbic acid and phloroglucinol control callus browning and induce indirect organogenesis in *Ficus religiosa* L. *Flower and Ornamental Plants*, 1(2), 51-58. <http://flowerjournal.ir/article-1-113-en.html>
- Jahan, M. T., Islam, M. R., Khan, R., Mamun, A. N. K., Ahmed, G., & Hakim, L. (2010). In vitro clonal propagation of Anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) using callus culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 19(1), 61-69. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v19i1.4961>
- Jia, Y., Ma, Y., Guo, Y., & Li, M. (2007). Study on Tissue Culture of *Anthurium andraeanum*. Lind—Abstract—Europe PMC. <https://europepmc.org/article/cba/631970>
- Jiang, L., Lan, T. W., Li, Y. H., Yi, M. S., Liang, C. H., & Zhang, Z. S. (2006). Factors influencing callus induction, proliferation and bud differentiation of *Anthurium andraeanum* Lind. *Seed*, 25(11), 26-30.
- Kane, M. (2003). Bacterial and fungal indexing of tissue cultures. *Journal of Allergy and Immunology*, 94, 393-400.
- Kharrazi, M., Moradian, M., Safari, N., Khadem, A., & Sharifi, A. (2022). Optimization of in vitro cultural conditions of *Haworthia* (*Haworthia Cooperi* Baker). *Plant Productions*, 45(1), 53-66. <https://doi.org/10.22055/ppd.2021.36744.1971>
- Kharrazi, M., Sharifi, A., Keykha Akhar, F., Bagheri, A., & Moradian, Y. M. (2018). Effect of hormonal compositions on micropropagation of fifteen cultivars of Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f.). *Plant Productions*, 40(4), 91-102. <https://doi.org/10.22055/ppd.2018.13443>
- Liu, G. F., Zhao, Q. Q., & Bao, M. Z. (2009). Factors affecting callus induction and plant regeneration from leaf explants of pot Anthurium (*Anthurium andraeanum* Lind.). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 28(3), 356-360.
- Manh Cuong, D., Cong Du, P., Tung, H. T., Ngan, H. T. M., Luan, V. Q., Phong, T. H., Khai, H. D., Phuong, T. T. B., & Nhut, D. T. (2021). Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis*—A valuable medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(3), 577-588. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02095-2>
- Martinez-Estrada, E., Caamal-Velazquez, J. H., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2016). Light emitting diodes improves in vitro shoot multiplication and growth of *Anthurium andraeanum* Lind. *Propagation of Ornamental Plants*, 16, 51-59.
- Mendi, Y. Y., Kacar, Y. A., Bicen, B., Cengiz, M., & Yildiz, C. (2024). Micropropagation of some Anthurium varieties for commercial in vitro production. *Book of Proceedings*, 181. <https://www.researchgate.net/profile/Viktor-Husak/publication/382887418>
- Mo, V. T., Cuong, L. K., Tung, H. T., Huynh, T. V., Nghia, L. T., Khanh, C. M., Lam, N. N., & Nhut, D. T. (2020). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed *Kappaphycus striatus*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 65-70. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-020-03102-3#citeas>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, 179-473. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Oyebanji, O. B., Nweke, O., Odeunmi, O., Galadima, N. B., Idris, M. S., Nnodi, U. N., Afolabi, A. S., & Ogbadu, G. H. (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 20-28. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/65980>
- Park, H. Y., Kim, K. S., Ak, G., Zengin, G., Cziaky, Z., JekHo, 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), 698. <https://doi.org/10.3390/plants10040698>
- Parzymies, M. (2021). Nano-silver particles reduce contaminations in tissue culture but decrease regeneration rate and slows down growth and development of *Aldrovanda vesiculosa* explants. *Applied Sciences*, 11(8), 3653. <https://doi.org/10.3390/app11083653>
- Pavallekoodi Gnasekaran, P. G., Xavier Rathinam, X. R., Uma Rani Sinniah, U. R. S., & Sreeramanan Subramaniam, S. S. (2010). A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBS) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid. *Journal of Physiology*, 29-33. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20113034564>
- Pinheiro, M. V. M., Martins, F. B., Cruz, A. C. F., Carvalho, A. C. P. P., Oliveira, E. J., & Otoni, W. C. (2014). Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. *Acta Scientiarum Agronomy*, 36, 87-98. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i1.16557>
- Pinheiro, M. V. M., Martins, F. B., da Cruz, A. C. F., de Carvalho, A. C. P. P., Ventrella, M. C., & Otoni, W. C. (2013). Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel somatic embryos from nodal segments. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(3), 304-312. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9522-z>
- Rahmati, Z., Payam Nour, V., Ghasemi Bezdi, K., & Ebrahimi, P. (2017). Optimization of culture medium for in vitro callogenesis in *Taxus baccata* L. and *T. brevifolia* Nutt. *Forest and Wood Products*, 70(3), 381-391. <https://doi.org/10.22059/jfw.2017.111443.561>

- Rezazadeh, B., Ghanbari, A., Pourberami Hir, Y., & Haghjooyan, R. (2021). Investigation of different disinfection treatments on the explants of Cranberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(1), 82-94.
- Ru, Z., Lai, Y., Xu, C., & Li, L. (2013). Polyphenol oxidase (PPO) in early stage of browning of Phalaenopsis leaf explants. *Journal of Agricultural Science*, 5(9), 57-64. <http://ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/28291/17614>
- Rybin, D. A., Sukhova, A. A., Syomin, A. A., Zdobnova, T. A., Berezina, E. V., & Brilkina, A. A. (2024). Characteristics of callus and cell suspension cultures of highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivated in the presence of different concentrations of 2,4-D and BAP in a nutrient medium. *Plants*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/plants13233279>
- Surre, J., Saint-Ruf, C., Collin, V., Orega, S., Ramjeet, M., & Matic, I. (2018). Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival. *Scientific Reports*, 8(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30623-2>
- Teixeira da Silva, J. A., Dobranszki, J., Winarto, B., & Zeng, S. (2015). Anthurium in vitro: A review. *Scientia Horticulturae*, 186, 266-298. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.024>
- Tung, H. T., Bao, H. G., Cuong, D. M., Ngan, H. T. M., Hien, V. T., Luan, V. Q., Vinh, B. V. T., Phuong, H. T. N., Nam, N. B., Trieu, L. N., Truong, N. K., Hoang, P. N. D., & Nhut, D. T. (2021a). Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57(6), 897-906. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10163-7>
- Tung, H. T., Nam, N. B., Huy, N. P., Luan, V. Q., Hien, V. T., Phuong, T. T. B., Le, D. T., Loc, N. H., & Nhut, D. T. (2018). A system for large scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes. *Scientia Horticulturae*, 232, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.063>
- Tung, H. T., Suong, P. T., Khai, H. D., Luan, V. Q., Cuong, D. M., Hien, V. T., Nam, N. B., Ngan, H. T. M., Bien, L. T., Phong, T. H., & Nhut, D. T. (2022). Protocorm-like body formation, stem elongation, and enhanced growth of *Anthurium andraeanum* 'Tropical' plantlet on medium containing silver nanoparticles. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 58(1), 70-79. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10217-w>
- Tung, H. T., Thuong, T. T., Cuong, D. M., Luan, V. Q., Hien, V. T., Hieu, T., Nam, N. B., Phuong, H. T. N., Van The Vinh, B., & Khai, H. D. (2021b). Silver nanoparticles improved explant disinfection, in vitro growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 145, 393-403. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02015-4>
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227-1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wani, M. A., Nazki, I. T., Din, A., Iqbal, S., Wani, S. A., Khan, F. U., & Neelofar, (2018). Floriculture sustainability initiative: The dawn of new era. In: Sustainable Agriculture Reviews. (ed. Lichtfouse, E.) Pp. 91-127. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75190-0_4
- Wu, A. L. (2010). Tissue culture in vitro and rapid propagation of *Anthurium andraeanum*. *Gemomics Applied Biology*, 29(1), 185-190.
- Yu YiXun, Y. Y., Liu Ling, L. L., Liu JuanXu, L. J., & Wang Jing, W. J. (2009). Plant regeneration by callus-mediated protocorm-like body induction of *Anthurium andraeanum*. *Horticultural Agricultural Science China*, 8(5), 572-577.
- Zamani, E., Dehestani-Ardakani, M., & Kamali Aliabad, K. (2019). Investigation the effects of different culture media on micropropagation of Abarkooh cypress plant (*Cupressus sempervirens* L. var. Horizontalis). *Journal of Wood and Forest Science and Technology*, 25(4), 19-34. <https://doi.org/10.22069/jwfst.2019.15248.1756>
- Zhang, Y., Qiao, Y., Zhang, W., Liu, X., Gong, R., Wang, Z., & Zhang, Y. (2025). In vitro induction and characterization of *Anthurium andraeanum* 'Pink Champion' tetraploids. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11627-024-10476-3>
- Zhou, L. L., Wang, J., Yan, J. F., Zheng, B. P., Zhang, S. C., & Tan, J. Z. (2012). Effects of different explants on the primary culture and callus induction of *Anthurium andraeanum*. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 40(28), 13720-13724.

Evaluation of the effect of silver nanoparticles and chemical disinfectants on reducing contamination and plant growth regulators on callus induction in anthurium (*Anthurium andraeanum* Lindl.) plant

Maryam Rahmati¹, Maryam Dehestani-Ardakani^{1, 2*}, Kazem Kamali Aliabad³ and Azam Jafari¹

¹ Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, P.O. Box 184, Ardakan, Iran

² Medicinal and Industrial Plant Research Institute, Ardakan, Iran

³ Department of Soil Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd
(Received: 2025/05/01, Accepted: 2025/08/26)

Abstract

In the present study, the micropropagation of Anthurium (*Anthurium andraeanum* Lindl.) was investigated in the form of two separate experiments. In the first experiment, the effect of different types of chemical disinfectants on the reduction of contamination in leaf and bud explants was tested in a factorial experiment within a completely randomized design with three replicates. The first factor included six different disinfection methods (S1, S2, S3, S4, S5, and S6), the second factor comprised two types of explants (leaf and bud), and the third factor included two cultivars of Anthurium (red and lipstick). The results showed that the lowest contamination rate (zero percent) was achieved in treatment S6 (silver nanoparticles) for the red cultivar and leaf explant, as well as in treatments S2 and S6 for the lipstick cultivar and leaf explant, and also in treatment S1 for the bud explant of the same cultivar. In the second experiment, the effect of plant growth regulators on callus induction in leaf explants of the “lipstick cultivar was investigated in a factorial design within a completely randomized design with three replicates. The first factor comprised 11 treatments (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, and T11), and the second factor included two types of culture media (MS and ½ MS). The highest callus formation was observed in T3 treatment (2 mg L⁻¹ BA + 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 5% coconut water), at a rate of 40.00%. For regeneration, the calluses were transferred to the MS medium containing 1 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ NAA + 1.5 mg L⁻¹ BA. Overall, the use of compounds such as silver nanoparticles and antibiotics showed a positive effect in reducing contamination in the explants, and the ½ MS medium combined with BA and 2,4-D proved to be effective in callus induction in leaf explants.

Keywords: Antibiotics, Callus, Contamination, Culture medium, Silver nanoparticle

Corresponding author, Email: mdehestani@ardakan.ac.ir