تأثیر نانوذرات نقره بر آلودگی میکروبی و رشد درون‌شیشه‌ای جوانه‌های جانبی و انتهایی ارقام فندق

The Effect of Silver Nano-particles on Microbial Contamination and *In Vitro* Growth of Apical and Auxiliary Buds of Hazelnut Cultivars

پریسا دریانی[۱]، ناصر زارع[۲*]، اسماعیل چمنی[۳]، پریسا شیخ‌زاده‌مصدق[۴] و داود جوادی‌مجد[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۴/۳۱

چکیده

جوانه‌های جانبی و انتهایی شش رقم فندق در فصول مختلف تهیه شده و پس از ضدعفونی با تیمارهای متفاوت، روی محیط‌کشت MS جامد کشت شدند. درصد ریزنمونه‌های رشد کرده و درصد ریزنمونه‌های دارای آلودگی قارچی و باکتریایی ثبت گردید. علاوه‌بر این، تأثیر سطوح مختلف BAP و IBA بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های فصول مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات‌نقره نقش مؤثری در کاهش آلودگی‌های میکروبی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های فندق به‌همراه حداقل صدمه به بافت‌های درحال رشد دارد. در ریزنمونه‌های فصل بهار، کمترین درصد آلودگی قارچی و باکتریایی به‌همراه بیشترین درصد شاخه‌دهی در تیمارهای ضدعفونی هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه و غوطه‌ورسازی ریزنمونه‌ها به‌مدت ۳۰ یا ۴۵ دقیقه در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات‌نقره پس از ضدعفونی با هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ به‌مدت ۵ دقیقه به‌دست آمد. محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بیشترین درصد شاخه‌دهی (۴۷/۲۲٪)، تعداد برگ (۶/۲۲) و طول ساقه (۱/۸۷ cm) را داشت که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر سطوح BAP بود. درحالی‌که در ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز کمترین درصد آلودگی باکتریایی و قارچی و بیشترین درصد شاخه‌دهی با غوطه‌ورسازی ریزنمونه‌ها به‌مدت ۱۲۰ دقیقه در محلول ۱۰۰ یا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات‌نقره پس از ضدعفونی با هیپوکلریت‌سدیم به‌دست آمد. بیشترین درصد شاخه‌دهی ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت حاوی ۳ یا ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی باکتریایی و قارچی، ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای، ضدعفونی، نانوذرات نقره، *Corylus avellana*

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۴. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۵. مربی بخش اصلاح نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، گیلان
*: نویسنده مسوول Email: zarenasser@yahoo.com

مقدمه

فندق با نام علمی *Corylus avellana* گیاهی است که از دیرباز به‌دلیل ارزش غذایی بالا در صنایع غذایی مورد توجه بوده است. دانه‌های فندق دارای ۱۹ درصد پروتئین، ۶۰ درصد روغن، درصد بالایی از ویتامین‌های B، E و عناصر معدنی مانند فسفر است. توزیع جغرافیایی فندق مناطق وسیعی از اروپا، آفریقا، روسیه، کوه‌های قفقاز و ایران را در برمی‌گیرد. امروزه با شناخت بهتر از این گیاه کاربردهای ویژه‌ای در صنعت و پزشکی برای آن در نظر گرفته شده است، با شناسایی و جداسازی تاکسوئیدهایی از برگ‌ها و پوسته‌های اطراف بذر فندق از یک‌سو و ارزش داروئی و اقتصادی بالای این متابولیت‌ها در درمان عمومی سرطان‌ها افق تازه‌ای در تولید اقتصادی این ماده با ارزش گشوده است. علاوه‌بر این از این گیاه برای تهیه بیودیزل، بیوپلاستیک نیز استفاده می‌گردد *تامسون* و همکاران؛ *هافمن* و همکاران؛ *هافمن و شهیدی* (Thompson *et al*., 1996; Hoffman *et al*., 1998; Hoffman and Shahidi, 2009). با توجه به تقاضای در حال افزایش برای فندق، تکثیر و توزیع سریع ارقام استاندارد و جدید حاصل از برنامه‌های اصلاحی بیش از پیش ضروری است. روش‌های سنتی تکثیر فندق با استفاده از بذر، قلمه و خوابانیدن زمان‌بر بوده و از کارآیی پایینی در ریزازدیادی تجاری برخوردار هستند. تکنیک ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای راهکار مناسبی را برای تکثیر انبوه و توزیع سریع لاین‌ها یا ارقام برتر و جدید در سطح تجاری فراهم می‌آورد. علاوه‌بر این، با استفاده از این تکنیک امکان تکثیر انبوه نهال‌های یکنواخت و عاری از بیماری و توزیع آن بین کشاورزان وجود دارد نوری-*ناس* (Nuri-NAS, 2003). سرعت شاخه‌زایی کم و میزان بالای آلودگی میکروبی از عوامل اصلی محدودکننده موفقیت در ریزازدیادی درختان می‌باشد. اغلب به‌منظور به حداقل رساندن مشکلات، از بافت‌های جوان (قاعده جوانه) درختان بالغ استفاده می‌شود *دیازسالا* و همکاران؛ *بجوانی و رزدان، کهریزی* و همکاران (Diaz-Sala, *et al*., 1994; Bhojwani and Razdan, 1996; Kahrizi *et al*., 2011).

برخی از روش‌ها و مواد شیمیایی برای کنترل آلودگی در محیط درون‌شیشه‌ای استفاده می‌شود، ولی برخی از این‌ها بهره‌وری پایینی و برخی هم اثرات سمی زیادی روی ریزنمونه دارند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز اثرات منفی در رشد و پاسخ ریزنمونه‌ها داشته و ممکن است در القای مقاومت در باکتری‌ها تأثیر بگذارند. به‌طورکلی استفاده از آن‌ها برای کشت بافت گیاهان پیشنهاد نمی‌شود *دبای* و همکاران (Dabai *et al*., 2007). کلرید جیوه ($HgCl_2$) به‌طور گسترده‌ای برای کنترل آلودگی گیاهان چوبی استفاده شده است ولی این ماده بسیار سمی بوده و باید با دقت بالایی مورد استفاده قرار گیرد *لیفرت و وودوارد* (Leifert and Woodward, 1997). چنین مواد شیمیایی نه تنها برای ریزنمونه بیش از حد سمی هستند، ممکن است برای محیط زیست نیز مخاطره‌آمیز باشند. تحت چنین شرایطی پیدا کردن یک ماده مؤثر و ایمن برای حذف آلودگی ریزنمونه‌ها (به‌خصوص برای گیاهان چوبی) بسیار مهم است. نانوذرات نقره موادی غیرسمی هستند که از قابلیت بالایی برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، به‌عنوان مثال، قارچ و باکتری‌ها برخوردار هستند. این قابلیت نانوذرات نقره به‌علت ذرات کوچک آزاد نقره می‌باشد. این ذرات کوچک نه تنها قادر به از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد، بلکه ویروس را نیز از بین می‌برند *ساندی* و *سالوپک – ساندی*؛ *عبدی* و همکاران (Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Abdi *et al*., 2008).

دامیانو و همکاران (Damiano *et al*., 2005) در مطالعه‌ی روی رقم‌های مختلف فندق در ایتالیا گزارش کردند که محیط‌کشت DKW (Driver and Kuniyuki Walnut) و MOLT که ترکیبی از محیط DKW و WPM (Woody Plant Medium) است، به‌همراه ۱/۵ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای مرحله شاخه‌زایی مناسب می‌باشد. *کوسنکو* و همکاران (Kosenko *et al*., 2009) نیز محیط MS ½ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) را محیط‌کشت مناسبی برای استقرار فندق گزارش کردند. این تحقیق به‌منظور ارزیابی کارآیی روش‌های مختلف ضدعفونی در حذف آلودگی ریزنمونه‌های جوانه انتهایی و جانبی فصول مختلف سال گیاه فندق و همچنین تاثیر غلظتهای مختلف مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر استقرار و رشد این ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سرشاخه‌های واجد جوانه فندق در تمام فصول سال از جنگل‌های رودسر استان گیلان (رقم گرد)، مرکز تحقیقات فندق در رودسر (رقم‌های فرتیل و روند) و پارس‌آباد استان اردبیل (رقم‌های نقرت، سگرب و داویانا) تهیه و در قطعات کوچک و بسته‌بندی‌های تمیز به آزمایشگاه منتقل شدند.

ضدعفونی ریزنمونه‌های فندق در فصول مختلف سال

ابتدا سرشاخه‌ها با مایع ظرفشویی به‌مدت ۳۰ دقیقه شسته شده و سپس به‌مدت دو ساعت با آب جاری آبکشی شدند. ریزنمونه‌های جوانه جانبی و انتهایی به‌مدت یک دقیقه در محلول ۷۰٪ الکل غوطه‌ور شده و سپس از سه روش زیر برای ضدعفونی در فصول مختلف استفاده شد *یو و رد، ساندی و سالوپک- ساندی* (Yu and Reed, 1993; 2004).

الف- ریزنمونه‌های تهیه شده در فصل بهار (ارقام گرد، فرتیل و روند) به‌مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و ریزنمونه‌های فصول تابستان، پائیز (ارقام نقرت، فرتیل، روند و گرد) و زمستان (ارقام گرد و فرتیل) به‌مدت ۲۵ دقیقه با هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ تیمار شدند.

ب- ریزنمونه‌های فصل بهار با محلول کلریدجیوه ۰/۰۵٪ به‌مدت دو و سه دقیقه و ریزنمونه‌های فصول تابستان، پائیز و زمستان با محلول کلریدجیوه ۰/۱٪ به‌مدت دو و سه دقیقه ضدعفونی شدند.

ج- به‌منظور بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌های فندق، ریزنمونه‌های تابستان و پاییز پس از تیمار با اتانول ۷۰٪ به‌مدت پنج دقیقه و محلول هیپوکلریت‌سدیم ٪۲/۵ به‌مدت ۲۰ دقیقه، به‌مدت ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه با محلول ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره (*عبدی* و همکاران، 2008؛ *رستمی و شهسوار* (Rostami and Shahsavar, 2009) تیمار شدند. ریزنمونه‌های بهار ضدعفونی شده با اتانول ۷۰٪ به‌مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به‌مدت پنج دقیقه، به‌مدت ۳۰ و ۴۵ دقیقه با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره تیمار شدند.

در هر سه روش در انتها ریزنمونه‌ها سه بار و هر بار به‌مدت پنج دقیقه با آب مقطر ضدعفونی آبکشی شدند. ریزنمونه‌های بدون ضدعفونی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. سه هفته بعد از کشت، کشت‌ها و ریزنمونه‌ها از نظر آلودگی و رشد ریزنمونه‌ها مورد بررسی و یادداشت‌برداری قرار گرفت. با توجه به وجود آلودگی داخلی باکتریایی در برخی از ریزنمونه‌ها و ظهور آن‌ها چند روز بعد از کشت ریزنمونه‌ها، امکان کنترل این نوع آلودگی از طریق استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و استرپتومایسین به‌ترتیب با غلظت‌های ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر رد و همکاران (Reed *et al*., 1998) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از یک هفته تا دو هفته رشد باکتری و همچنین ریزنمونه‌ها یادداشت گردید.

مرحله استقرار و تیمارهای هورمونی

ریزنمونه‌های فصل بهار ارقام گرد، فرتیل و روند ضدعفونی شده، پس از آبگیری با کاغذ صافی روی محیط‌کشت NRM *باچتا* و همکاران (Bacchetta *et al*., 2008) حاوی سطوح مختلف هورمونی BAP (صفر، ۱، ۲، ۳، ۵ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. درصد ریزنمونه‌های رشد کرده (درصد شاخه‌دهی)، طول ساقه، تعداد برگ و طول میان‌گره‌ها حدود سه تا چهار هفته پس از کشت اندازه‌گیری و ثبت شد. ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز رقم داویانا روی محیط‌کشت MS *موراشیگ و اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962) حاوی سطوح مختلف هورمون BAP (صفر، ۳، ۵، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند. ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز رقم فرتیل روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه سطوح مختلف BAP (صفر، ۳، ۵، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. هر دو آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

ریزنمونه‌های ارقام گرد و فرتیل تهیه شده در فصل زمستان، پس از ضدعفونی روی محیط‌کشت MS حاوی سطوح مختلف GA_3 (صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه ۰/۰۳، ۰/۰۵ و ۰/۰۷ گرم در لیتر کازئین یا دو گرم در لیتر عصاره مخمر کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در این آزمایش‌ها، درصد ریزنمونه‌های رشد کرده (درصد شاخه‌دهی)، حدود سه تا چهار هفته پس از کشت اندازه‌گیری و ثبت شد.

در طول آزمایش، همه کشت‌ها در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی لامپ فلورسنت و ۸ ساعت تاریکی و دما ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ver. 19) انجام و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن درسطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

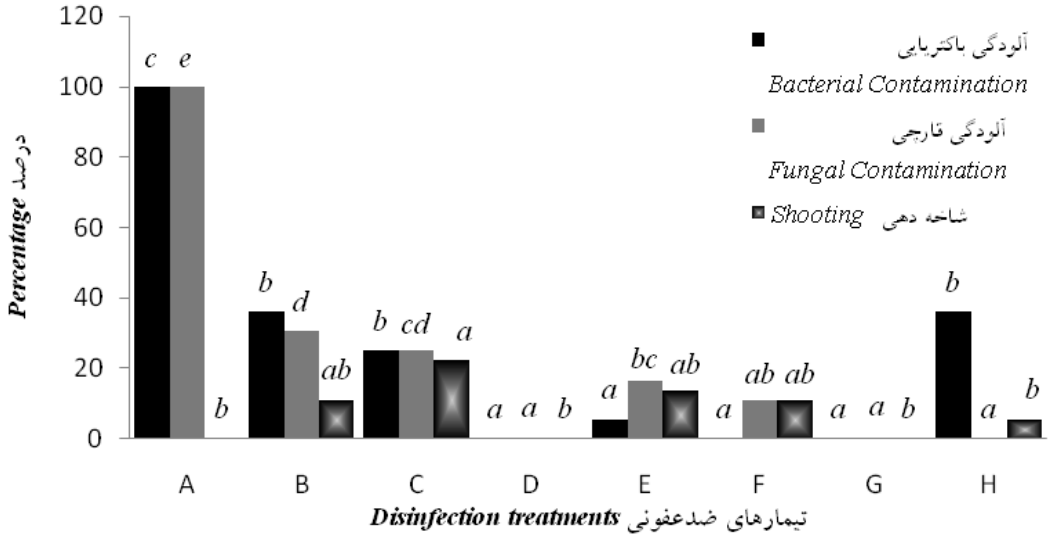
نتایج

۱. تأثیر تیمارهای مختلف ضدعفونی

ریزنمونه‌های فصل بهار

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای ضدعفونی مورد استفاده برای ریزنمونه‌های فصل بهار از نظر درصد آلودگی باکتریایی و قارچی و همچنین درصد شاخه‌دهی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. ولی بین ارقام از نظر این صفات

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اثر متقابل رقم × تیمار ضدعفونی نیز برای هیچ کدام از صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود. کمترین آلودگی قارچی و باکتریایی به‌همراه بیشترین درصد شاخه‌دهی در تیمار ضدعفونی با هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه و تیمار هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ به‌مدت ۵ به‌علاوه تیمار با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به‌مدت ۳۰ یا ۴۵ دقیقه به‌دست آمد. درحالی‌که در تیمار شاهد ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها در اثر آلودگی قارچی و باکتریایی از بین رفتند (شکل ۱). تیمار ریزنمونه‌ها با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به‌مدت ۳۰ یا ۴۵ دقیقه پس از ۵ دقیقه ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، درصد آلودگی قارچی و باکتریایی را به‌طور معنی‌داری نسبت به ۵ دقیقه ضدعفونی با هیپوکلریت ۲/۵٪ کاهش داده ولی تأثیر معنی‌داری در رشد (شاخه‌دهی) ریزنمونه‌ها نداشت. علاوه‌بر این، افزایش مدت تیمار با هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ به ۱۵ دقیقه، اگرچه باعث حذف کامل آلودگی قارچی و باکتریایی شده، منجر به از بین رفتن کامل ریزنمونه‌ها نیز شده است به‌طوری‌که در این تیمار هیچ یک از ریزنمونه‌ها قادر به رشد نبودند. همچنین، اگرچه تیمارهای ضدعفونی کلریدجیوه باعث کنترل آلودگی‌های میکروبی شدند، ولی باعث از بین رفتن ریزنمونه‌ها نیز شدند (شکل ۱).



شکل ۱: میانگین درصد آلودگی باکتریایی، قارچی و شاخه‌دهی جوانه‌های فصل بهار فندق در تیمارهای مختلف ضدعفونی، A : بدون ضدعفونی، B، C و D: ضدعفونی با الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به‌ترتیب به‌مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه؛ E و F: ضدعفونی با الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به‌مدت ۵ به‌علاوه تیمار با محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به‌مدت ۳۰ یا ۴۵ دقیقه، G و H: کلریدجیوه ۰/۰۵ درصد به‌مدت ۲ و ۳ دقیقه

Fig. 1: Mean of percentage of bacterial and fungal contamination and shooting of hazelnut buds excised during spring in different disinfection treatments, A: without disinfection, B, C and D: disinfected with 70% ethanol and sodium hypochlorite 2/5% for 5, 10 and 15 minutes, respectively; E and F: disinfected with 70% ethanol and sodium hypochlorite 2/5% for 5 minutes and silver nanoparticles solution (100 mg/l) for 30 or 45 minutes, respectively; G and H: mercuric chloride 0/05% for 2 or 3 minutes, respectively

ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز

براساس نتایج حاصل، درصد آلودگی باکتریایی و قارچی و درصد شاخه‌دهی ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر ارقام و تیمارهای ضدعفونی قرار گرفت. علاوه‌بر این، اثر متقابل رقم × تیمار ضدعفونی نیز برای درصد آلودگی باکتریایی و شاخه‌دهی معنی‌دار بود. همان‌طوری‌که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد برخلاف ریزنمونه‌های فصل بهار، ضدعفونی ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ به‌تنهایی قادر به کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی و در نتیجه فراهم‌کردن شرایط رشد ریزنمونه‌ها نبود. به‌طوری‌که متوسط درصد آلودگی باکتریایی و قارچی به‌ترتیب ۸۳/۳۳ و ۵۵/۳۳ و درصد شاخه‌دهی ریزنمونه‌ها ۵/۳۳ بود. درحالی‌که درصد آلودگی باکتریایی و قارچی در تیمار ریزنمونه‌ها با محلول ۱۰۰ یا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره، به‌ویژه در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه، به‌طور

معنی‌داری کاهش یافته و درصد شاخه‌دهی (رشد) ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۲).

جدول ۱: میانگین درصد آلودگی باکتریایی، قارچی و شاخه‌دهی جوانه‌های فصل تابستان و پاییز فندق در تیمارهای مختلف ضدعفونی

Table 1: Mean of percentage of bacterial and fungal contamination and shooting of hazelnut buds excised during summer and autumn in different disinfection treatments

تیمار ضدعفونی Disinfection treatment	رقم Cultiva	درصد آلودگی باکتریایی Bacterial contamination	درصد آلودگی قارچی Fungal contamination	شاخه‌دهی Shooting	تیمار ضدعفونی Disinfection treatment	رقم Cultivar	درصد آلودگی باکتریایی Bacterial contamination	درصد آلودگی قارچی Fungal contamination	شاخه‌دهی Shooting
A	نقرت (Neghret)	100^{d}	100^{e}	0^{d}	A	گرد (Gard)	100^{c}	100^{a}	0^{c}
B	نقرت (Neghret)	83.33^{c}	40^{cd}	21.66^{c}	B	گرد (Gard)	100^{c}	83.33^{a}	0^{c}
C	نقرت (Neghret)	0^{a}	20.33^{b}	4^{d}	C	گرد (Gard)	0^{a}	40^{bc}	0^{c}
D	نقرت (Neghret)	1.25^{a}	0^{a}	0^{d}	D	گرد (Gard)	0^{a}	25.16^{c}	5.5^{b}
E	نقرت (Neghret)	8.33^{a}	53.33^{d}	31.66^{b}	E	گرد (Gard)	75^{b}	50^{b}	0^{c}
F	نقرت (Neghret)	16.66^{b}	16.66^{b}	66.66^{a}	F	گرد (Gard)	100^{c}	58.33^{ab}	0^{c}
G	نقرت (Neghret)	19.44^{b}	16.66^{b}	25^{c}	G	گرد (Gard)	100^{c}	50^{b}	0^{c}
H	نقرت (Neghret)	0^{a}	33.33^{c}	25^{c}	H	گرد (Gard)	100^{c}	25^{c}	8.33^{a}
A	فرتیل (Fertile)	100^{d}	100^{d}	0^{c}	A	روند (Rond)	100^{d}	100^{c}	0^{b}
B	فرتیل (Fertile)	7^{c}	50^{c}	0^{c}	B	روند(Rond)	85^{c}	50^{b}	0^{b}
C	فرتیل (Fertile)	0^{a}	26.60^{b}	2.79^{c}	C	روند (Rond)	0^{a}	17.62^{a}	5.63^{a}
D	فرتیل (Fertile)	0^{a}	22.15^{b}	0^{c}	D	روند(Rond)	0^{a}	37^{ab}	0^{b}
E	فرتیل (Fertile)	30.33^{b}	44^{bc}	44^{b}	E	روند (Rond)	25^{b}	58.33^{b}	0^{b}
F	فرتیل (Fertile)	11^{ab}	44^{bc}	44^{b}	F	روند(Rond)	33.33^{b}	50^{b}	0.33^{b}
G	فرتیل (Fertile)	0^{a}	22^{b}	44^{b}	G	روند (Rond)	8.33^{a}	50^{b}	0^{b}
H	فرتیل (Fertile)	0^{a}	0^{a}	66^{a}	H	روند(Rond)	0^{a}	16.66^{a}	0^{b}

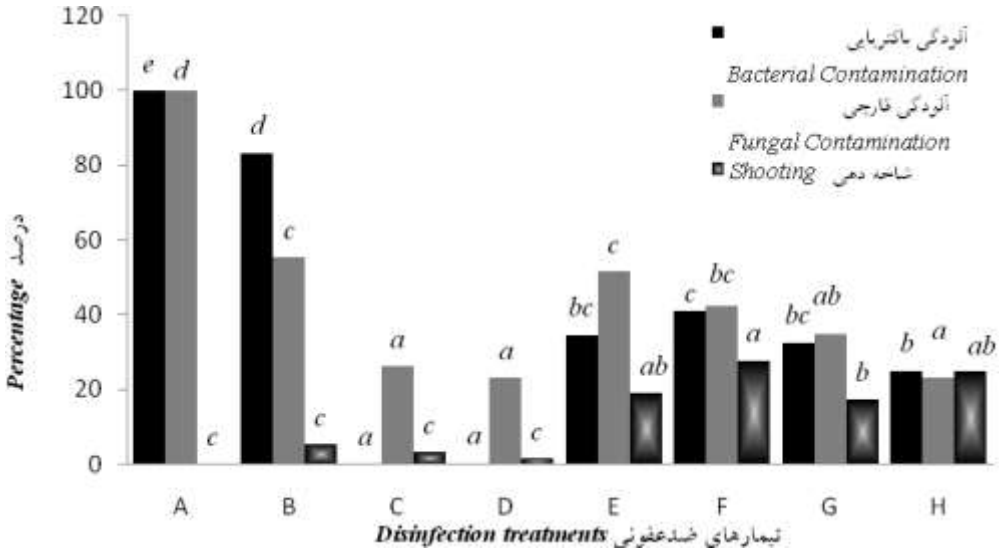
حروف یکسان در هر صفت بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P\leq0.05$ است

A: بدون ضدعفونی، B: ضدعفونی با الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت ۲/۵٪، C و D: کلریدجیوه ۰/۰۱ درصد به‌ترتیب به‌مدت ۲ و ۳ دقیقه، E و F: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به‌ترتیب در دو زمان ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه، G و H: ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به‌ترتیب در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه

Values followed by different letters in each trait are significantly different at $P\leq0.05$.
A: without disinfection, B: disinfected with 70% ethanol and sodium hypochlorite 2/5%; C and D: mercuric chloride 0/01% solution for 2 or 3 minutes; E and F: silver nanoparticle solution (100mg/l) for 60 and 120 minutes; G and H: silver nanoparticle solution (150mg/l) for 60 and 120 minutes

در رقم فرتیل تیمار نانوذرات نقره با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه میزان آلودگی باکتریایی و قارچی را به‌طور کامل برطرف کرده و ۶۶ درصد ریزنمونه‌ها رشد کرده و تولید شاخه نمودند. درحالی‌که با این تیمار ضدعفونی در رقم نقرت، علیرغم کاهش درصد آلودگی باکتریایی و قارچی، درصد ریزنمونه‌های رشد کرده به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. در این رقم حداکثر درصد شاخه‌دهی (۶۶٪) با تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره به‌مدت ۱۲۰ دقیقه به‌دست آمد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از درصد شاخه‌دهی این رقم در سایر تیمارها بود. در رقم روند علیرغم کاهش معنی‌دار و قابل ملاحظه درصد آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌ها به‌ویژه با تیمارهای ضدعفونی کلرید جیوه و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره به‌مدت ۱۲۰ دقیقه، درصد ریزنمونه‌های رشد کرده بسیار پایین بود (جدول ۱).

برای کنترل آلودگی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای که آلودگی باکتریایی داشتند از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و استرپتومایسین به‌ترتیب با غلظت‌های ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که این آنتی‌بیوتیک‌ها سبب کاهش ۵۰ درصدی آلودگی باکتریایی شده (رشد باکتری در ۵۰٪ ریزنمونه‌ها مهار شده است)، اما از طرفی موجب محدود شدن رشد ریزنمونه‌ها و گیاهچه‌ها و همچنین تغییر رنگ آن‌ها نیز گردیدند و به همین خاطر در ادامه آزمایش از این تیمارها استفاده نشد.



شکل ۲: میانگین درصد آلودگی باکتریایی، قارچی و شاخه‌دهی جوانه‌های فصل تابستان و پاییز فندق در تیمارهای مختلف ضدعفونی؛ A: بدون ضدعفونی، B: ضدعفونی با الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، C و D: کلرید جیوه ۰/۰۱ درصد به‌ترتیب به‌مدت ۲ و ۳ دقیقه، E و F: ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به‌ترتیب در دو زمان ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه G و H: ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به‌ترتیب در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه

Fig. 2: Mean of percentage of bacterial and fungal contamination and shooting of hazelnut buds excised during summer and autumn in different disinfection treatments; A: without disinfection; B: disinfected with 70% ethanol and sodium hypochlorite 2.5%; C and D: mercuric chloride 0.01% for 2 or 3 minutes; E and F: silver nanoparticle solution (100 mg/l) for 60 and 120 minutes, G and H: silver nanoparticle solution (150 mg/l) for 60 and 120 minutes

۲. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر رشد ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌های فصل بهار

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف BAP از نظر درصد شاخه‌دهی، تعداد برگ، طول ساقه و میان‌گره (cm) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. درحالی‌که بین ارقام مورد استفاده اختلاف معنی‌داری از نظر این صفات وجود نداشت. علاوه‌بر این، اثر متقابل رقم × تیمار نیز در مورد همه صفات معنی‌دار به‌دست آمد.

در بین سطوح مختلف BAP مورد بررسی، غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین درصد شاخه‌دهی، تعداد برگ، طول ساقه و طول میان‌گره به‌ترتیب ۴۷/۲۲٪، ۶/۲۲، ۱/۸۷ cm و ۰/۳۵ cm را داشت که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سطوح دیگر BAP بود. با افزایش غلظت BAP درصد شاخه‌دهی، تعداد برگ، طول ساقه و طول میان‌گره به‌طور معنی‌داری کاهش یافته و ریزنمونه‌های رشد کرده حالت کپه‌ای به خود گرفتند. به‌طوری‌که، از نظر صفات مورد بررسی غلظت‌های دو میلی‌گرم بر لیتر BAP و بالاتر از آن تفاوت معنی‌داری با تیمار فاقد BAP (شاهد) نداشتند (جدول ۲، شکل ۳-A).

در رقم روند، درصد شاخه‌دهی و تعداد برگ تیمار فاقد BAP و حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA تفاوت معنی‌داری با تیمار حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA نداشته و به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. با این حال، طول ساقه و میان‌گره رشده کرده این رقم در محیط حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط فاقد BAP بود. به‌عبارت دیگر، در رقم روند، محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA شاخه‌های مناسب‌تری را برای مرحله تکثیر فراهم می‌آورد (جدول ۲). در ارقام دیگر (گرد و فرتیل) هیچ‌گونه رشد ریزنمونه و شاخه‌دهی در محیط‌کشت فاقد BAP دیده نشد. درصد شاخه‌دهی رقم گرد در دو محیط‌کشت حاوی یک یا دو میلی‌گرم بر لیتر به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA تفاوت معنی‌داری با هم نداشته و به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. با این حال، تعداد برگ، طول ساقه و میان‌گره در محیط حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌کشت حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر BAP و سایر سطوح آن به‌دست آمد. در رقم فرتیل نیز محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بهترین تیمار برای رشد ریزنمونه‌ها بود. به‌طوری‌که درصد شاخه‌دهی و تعداد برگ حاصل از این محیط‌کشت به‌طور

معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بوده ولی از نظر صفات طول ساقه و طول میان‌گره تفاوت معنی‌داری با محیط‌کشت حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA نداشت (جدول ۲).

جدول ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف BAP در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بر رشد ریزنمونه‌های جوانه جانبی و انتهایی فصل بهار فندق

Table 2: Effect of different concentrations of BAP in combination with 0/01 mg /l IBA on growth of apical and auxiliary bud explants of hazelnut excised during spring

طول میان‌گره (cm) Internodes length	طول ساقه (cm) Stem length	تعداد برگ Number of leaves	شاخه‌دهی(%) Shooting (%)	رقم Cultivar	BAP (mgl^{-1})	طول میانگره (cm) Internodes length	طول ساقه (cm) Stem length	تعداد برگ Number of leaves	شاخه‌دهی(%) Shooting (%)	رقم Cultivar	BAP (mgl^{-1})
0^{c}	0^{c}	0^{c}	0^{d}	گرد (Gard)	3	0.13^{b}	1.1^{b}	6.66^{a}	41.66^{a}	روند (Rond)	0
0.13^{b}	0.76^{b}	3.66^{ab}	25^{b}	گرد (Gard)	5	0.4^{a}	1.2^{a}	7^{a}	50^{a}	روند (Rond)	1
0.1^{b}	0.5^{bc}	2.66^{b}	16.66^{c}	گرد (Gard)	8	0^{c}	0^{c}	0^{b}	0^{b}	روند (Rond)	2
0^{c}	0^{c}	0^{c}	0^{c}	فرتیل (Fertile)	0	0^{c}	0^{c}	0^{b}	0^{b}	روند (Rond)	3
0.3^{a}	1.96^{ab}	6.33^{a}	41.66^{a}	فرتیل (Fertile)	1	0^{c}	0^{c}	0^{b}	0^{b}	روند (Rond)	5
0.36^{a}	2.43^{a}	5^{b}	25^{b}	فرتیل (Fertile)	2	0^{c}	0^{c}	0^{b}	0^{b}	روند (Rond)	8
0^{c}	0^{c}	0^{c}	0^{c}	فرتیل (Fertile)	3	0^{c}	0^{c}	0^{c}	0^{d}	گرد (Gard)	0
0.2^{b}	1.6^{b}	7^{a}	25^{b}	فرتیل (Fertile)	5	0.4^{a}	1.53^{a}	5.33^{a}	50^{a}	گرد (Gard)	1
0^{c}	0^{c}	0^{c}	0^{c}	فرتیل (Fertile)	8	0.1^{b}	0.33^{c}	2^{b}	50^{a}	گرد (Gard)	2

حروف یکسان در هر ستون بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P\leq0.05$ است

Values followed by different letters in each trait are significantly different at $P\leq0.05$

ریزنمونه‌های فصل تابستان و پاییز

نتایج حاصل نشان داد که در رقم داویانا، بین تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اختلاف معنی‌داری از نظر درصد شاخه‌دهی وجود دارد. ریزنمونه‌های رقم داویانا کشت شده روی محیط‌کشت‌های فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و حاوی فقط IBA هیچ‌گونه رشد و شاخه‌دهی نشان ندادند. درحالی‌که، درصد شاخه‌دهی در محیط‌کشت‌های حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۰۱، ۰/۰۵ یا ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر محیط‌های کشت بود. در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، IBA۰/۲ درصد شاخه‌دهی به‌ترتیب ۵۰، ۵۰، ۵۰ و ۳۰ بود که از نظر آماری مشابه هم بوده و به‌طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌های کشت فاقد BAP و حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP است. با افزایش غلظت BAP به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، درصد شاخه‌زایی به‌طور چشم‌گیری کاهش یافته و به صفر درصد رسید (شکل ۴).

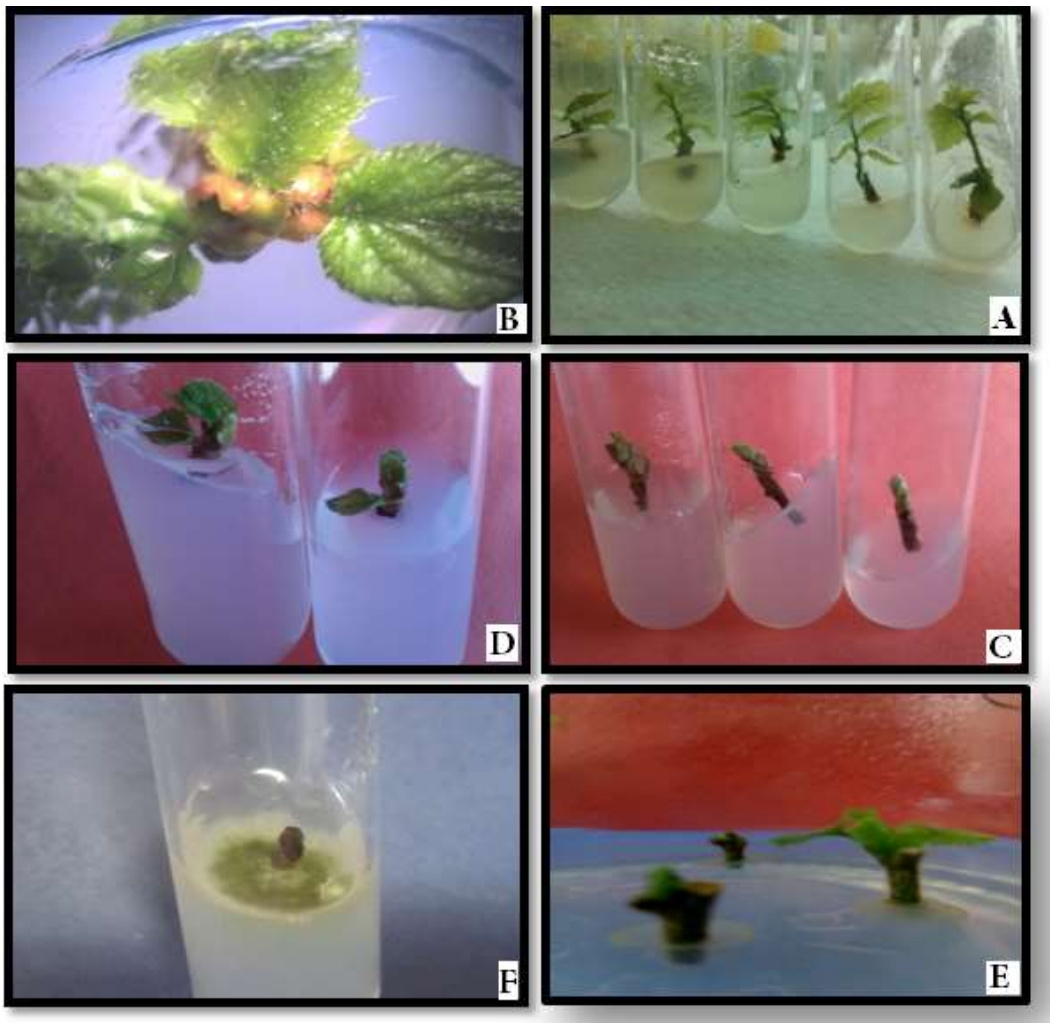
ریزنمونه‌های فصل زمستان

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای مختلف هورمونی و ارقام مختلف از نظر درصد جوانه‌های رشد کرده اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در محیط شاهد (MS فاقد هورمون) و محیط‌های حاوی فقط ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 ریزنمونه‌ها هیچ‌گونه رشد و شاخه‌دهی نشان ندادند. برخی از ریزنمونه‌های کشت شده در تیمارهای حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به تنهایی یا به‌همراه ۰/۰۳، ۰/۰۵ و ۰/۰۷ گرم در لیتر کازئین یا ۲ گرم در لیتر عصاره مخمر رشد کرده و شاخه تولید کردند (شکل ۶). محیط‌کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به همراه ۰/۰۳ گرم در لیتر کازئین بیشترین درصد (۲۲ درصد) رشد جوانه‌ها را نشان داد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل‌های D-۳ و ۶). لازم به ذکر است که درصد رشد و شاخه‌دهی ریزنمونه‌ها در ارقام مختلف متفاوت بود. به‌طوری‌که در اغلب تیمارها درصد شاخه‌دهی رقم روند بیشتر از رقم گرد بود. برای مثال، تیمار حاوی دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 به‌همراه ۰/۰۳ گرم در لیتر کازئین بیشترین درصد رشد ریزنمونه‌ها (۶۶ درصد) را در رقم روند نشان داد.

بحث

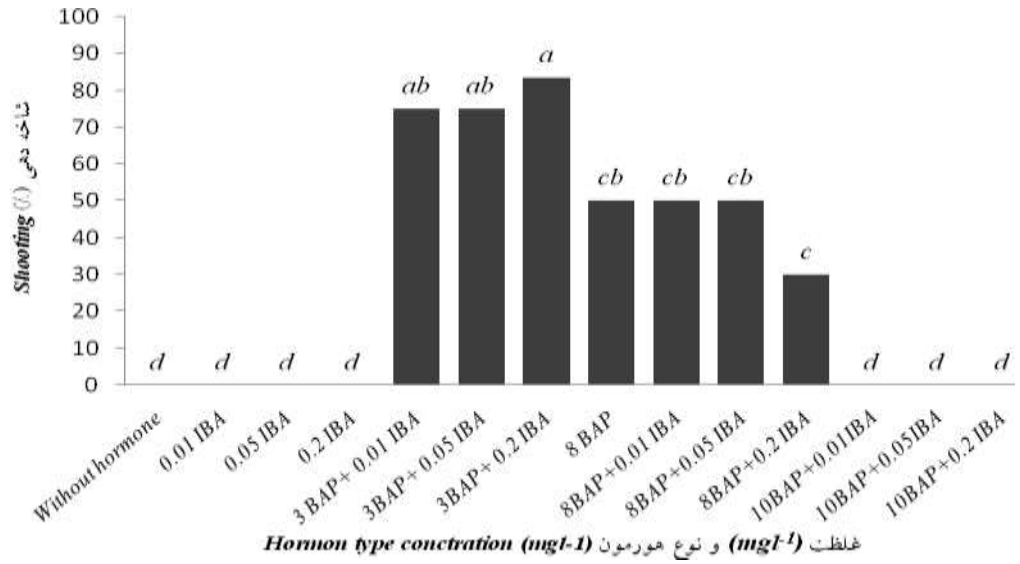
آلودگی مواد گیاهی (ریزنمونه) در کنار قابلیت کم ریخت‌زایی از محدودیت‌های عمده ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای فندق هستند. به‌طوری‌که گزارش شده که حدود ۹۵ درصد ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده از طبیعت احتمال آلودگی دارند *دیاز-سالا* و همکاران؛ رد و همکاران، 1990؛ *دامیانا* و همکاران، 2005 (Diaz-Sala *et al*., 1990). از طرف دیگر، به‌نظر می‌رسد که

جوانه‌ها و به‌ویژه جوانه‌های در حال رشد حساس به مواد ضدعفونی‌کننده بوده و علایم نکروز نشان می‌دهند (*باچتا* و همکاران، 2008). در این تحقیق نتایج ضدعفونی با تیمارهای مختلف در فصل بهار نشان داد که تیمارهای مختلف رابطه مستقیم با بافت ریزنمونه‌ها دارد. به عبارت دیگر با توجه به این‌که ریزنمونه‌های فصل بهار تازه و نرم بوده و از آلودگی کمتری نسبت به فصل‌های دیگر برخوردار هستند، باید از تیمار ضدعفونی ضعیف و غلظت‌های پایین‌تری که کمتر به سلول‌های ریزنمونه آسیب می‌رساند، استفاده شود. در این آزمایش، برای ریزنمونه‌های فصل بهار هیپوکلریت‌سدیم مناسب‌تر از نانوذرات‌نقره و کلریدجیوه (که خاصیت ضدعفونی‌کنندگی قوی دارد) بود. تیمارهای ضدعفونی با کلریدجیوه بیشترین تاثیر را برای رفع آلودگی باکتریایی و قارچی داشته ولی به‌علت سمیت بالا، درصد زنده‌مانی و شاخه‌دهی ریزنمونه‌ها در این تیمارها بسیار پایین بوده و با تیمار شاهد (بدون ضدعفونی) اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل‌های ۱ و ۲).



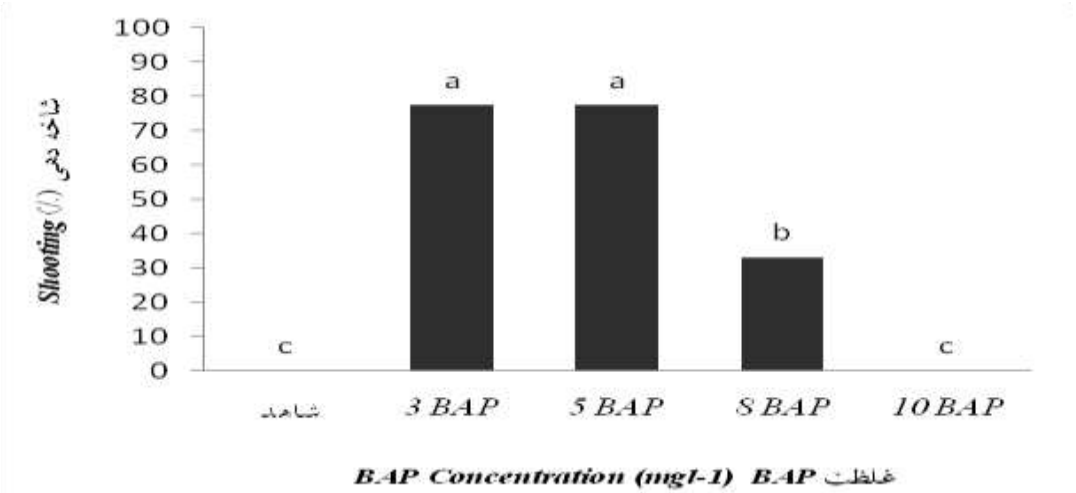
شکل ۳: رشد درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های جوانه‌های انتهایی و جانبی فندق؛ A) ریزنمونه‌های فصل بهار کشت شده در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA؛ B و C) ریزنمونه‌های فصل تابستان رقم فرتیل کشت شده در محیط‌کشت MS حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ؛ D) ریزنمونه‌های فصل زمستان کشت شده در محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به‌همراه ۰/۰۳ گرم در لیتر کازئین؛ E و F) به‌ترتیب آلودگی باکتریایی و قارچی در ریزنمونه‌های رقم گرد

Fig. 3: *In vitro* Growth of apical and auxiliary buds of hazelnuts, A) explants excised during spring and cultivated on MS medium containing 1mg/l BAP and 0.01 mg/ l IBA; B and C) explants of Fertyl cv. excised during spring and cultured on MS medium containing 3 mg/l BAP and 0.01 mg/ l IBA; D) explants excised during winter and cultured on MS medium containing 2 mg/l GA_3 and 0.03 g/l Casein hydrolisate; E and F) bacterial and fungal contamination of Gard cv. explants



شکل ۴: تأثیر غلظت‌های مختلف IBA و BAP بر درصد شاخه‌دهی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های جوانه انتهایی و جانبی فصل تابستان و پاییز رقم داویانا فندق

Fig. 4: The effect of different concentrations of BAP and IBA on *in vitro* shooting of apical and auxiliary bud explants of Davina cv. of hazelnut excised during summer and autumn

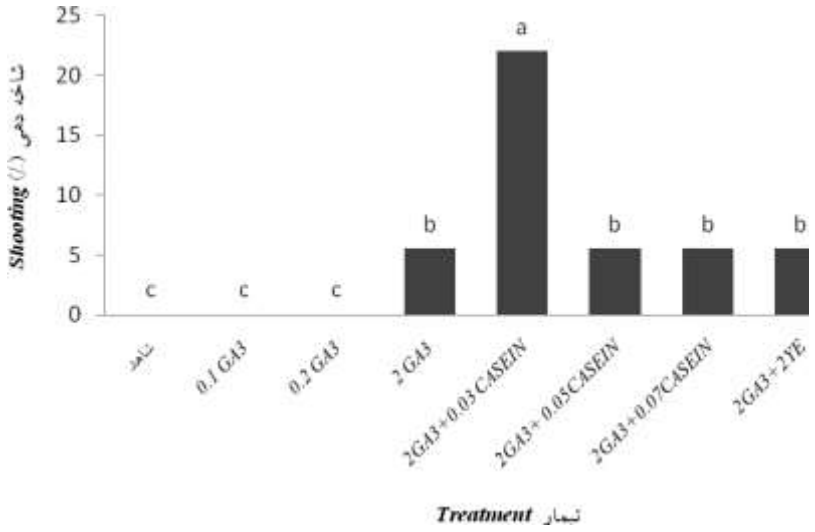


شکل ۵: تأثیر غلظت‌های مختلف BAP بر درصد شاخه‌دهی درون‌شیشه‌ای جوانه‌های انتهایی و جانبی فصول تابستان و پاییز رقم فرتیل فندق

Fig. 5: The effect of different concentrations of BAP on *in vitro* shooting of apical and auxiliary bud explants of Fertyl cv. of hazelnut excised during summer and autumn

به‌طورکلی در ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز، ارقام فرتیل و نقرت در اغلب تیمارهای ضدعفونی نسبت ارقام روند و گرد از درصد آلودگی باکتریایی و قارچی کمتر و درصد شاخه‌دهی بالایی برخوردار بودند. با این حال پاسخ ارقام به تیمارهای ضدعفونی متفاوت بود که این امر نشانگر اثر متقابل بین رقم و تیمار ضدعفونی است. به‌عبارت دیگر، واکنش همه ارقام به تیمارهای ضدعفونی یکسان نبود. این امر نشان می‌دهد که برای به‌دست آوردن ریزنمونه‌هایی با حداقل آلودگی، حداکثر زنده‌مانی و پتانسیل رشد و در نتیجه استقرار مطلوب ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای، بسته به رقم از تیمارهای ضدعفونی متفاوتی باید استفاده کرد. کلریدجیوه از خاصیت ضدعفونی‌کنندگی قوی برخوردار است (*لیفرت و وودوارد*، 1997). بنابراین در ارقامی مانند رقم گرد (از ارقام بومی در شمال کشور) که در این مطالعه آلودگی ریزنمونه‌های آن توسط حتی غلظت‌های بالای هیپوکلریت‌سدیم برطرف نشد، استفاده از کلریدجیوه می‌تواند موثر باشد. ولی رقم نقرت در تیمارهای ضدعفونی ملایم‌تر از توان رشدی بیشتر و در تیمارهای ضدعفونی شدید از رشد کمتری برخوردار بود (جدول ۱).

بنابراین، در ریزنمونه‌های فصول تابستان و پاییز، تیمار بهینه برای حصول حداکثر شاخه‌دهی به‌همراه حداقل آلودگی باکتریایی و قارچی بسته به رقم مورد استفاده متفاوت خواهد بود (جدول ۱).



شکل ۶: تأثیر تیمارهای مختلف بر درصد شاخه‌دهی درون‌شیشه‌ای جوانه‌های انتهایی و جانبی فصل زمستان فندق
YE: عصاره مخمر؛ GA_3: اسید جیبرلیک (بر حسب میلی‌گرم بر لیتر)؛ CA: کازئین هیدرولایسیت (بر حسب گرم بر لیتر)
Fig. 6: The effect of different treatments on *in vitro* shooting of apical and auxiliary bud explants of of hazelnut excised during winter. YE: yeast extract (g/l); GA3: Gibberellic acid (mg/l); CA: Casein Hydrolysate (mg/l)

اگرچه غلظت نانوذرات نقره و مدت زمان تیمار موثر برای ریزنمونه‌های فصول مختلف متفاوت بود. با این حال، هم در فصل بهار و هم در فصول تابستان و پاییز، حداقل آلودگی قارچی و باکتریایی به همراه حداکثر رشد ریزنمونه‌های کشت شده در تیمار هیپوکلریت‌سدیم به‌علاوه تیمار با محلول نانوذرات نقره به‌دست آمد (شکل‌های ۱ و ۲). یون‌های نقره و ترکیباتی بر پایه نقره از قابلیت بالایی برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، به‌عنوان مثال، قارچ و باکتری‌ها برخوردار بوده و اثرات کشندگی آن در ۱۶ گونه مختلف باکتریایی به اثبات رسیده است. با این‌حال، موقع استفاده از نانوذرات نقره سطح تماس با میکروب به مقدار زیادی افزایش یافته و در نتیجه اثرات ضدمیکروبی آن هم تقویت می‌شود. اگرچه نحوه عمل نانوذرات نقره روی میکروب‌ها به‌خوبی مشخص نشده، ولی فرضیه‌هایی مبنی بر لیز شدن سلول و همچنین مهار رشد میکروب‌ها توسط نانوذرات نقره پیشنهاد شده است *ساندی و سالوپک-ساندی*، 2004؛ *پراب‌هو و پولوز* (Prabhu and Poulose, 2012). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان داد که نانوذرات نقره می‌تواند در کاهش آلودگی‌های میکروبی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های فندق به‌همراه حداقل صدمه به بافت‌های درحال رشد نقش مؤثری داشته باشد. *عبدی* و همکاران (2008) اثرات نانوذرات نقره را بر کنترل آلودگی داخلی سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) بررسی کرده و بهترین نتایج را پس از ضدعفونی سطحی ریزنمونه سنبل‌الطیب در ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات‌نقره به‌مدت ۶۰ دقیقه به‌دست آوردند. فرو بردن ریزنمونه زیتون در نانوذرات نقره پس از ضدعفونی سطحی نیز نشان داده که نانوذرات نقره در کنترل آلودگی‌های باکتریایی و قارچی بسیار مؤثر است. با این حال، این روش به‌دلیل صدمات شدید، غیرقابل اجرا برای ریزنمونه زیتون گزارش شده است (*رستمی و شهسوار*، 2009).

اکسین‌ها و سایتوکنین‌ها مهم‌ترین عواملی هستند که تقسیم، رشد و همچنین ریخت‌زایی سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی هم در کشت درون‌شیشه‌ای و در گیاه کامل تنظیم نموده و به ویژه در انتقال مرحله G1 به S و G2 به M در چرخه تقسیم سلولی ضروری هستند. اکسین‌ها با تحریک اسیدی شدن دیواره سلولی منجر به افزایش انبساط‌پذیری (extensibility) آن می‌شوند. از طرف دیگر، اکسین باعث القاء رونویسی mRNAهای رمزکننده پروتئین‌های مرتبط با رشد سلولی می‌شوند. سایتوکنین‌ها نیز از طریق تنظیم تولید پروتئین‌های درگیر در رشته‌های دوک، به‌طور مستقیم چرخه سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند *استالز و اینز*؛ *ریچارد* و

همکاران؛ *سیلوریا* و همکاران (Stals and Inze, 2001; Richard *et al*., 2002; Silveria *et al*., 2004).

به‌طورکلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد در فصل بهار غلظت پایین BAP به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA شرایط رشدی مناسبی را برای رشد ریزنمونه‌های جوانه جانبی و انتهایی فندق فراهم می‌نماید. با این حال، معنی‌دار بودن اثر متقابل رقم و BAP بیانگر این امر می‌باشد که پاسخ رشدی ریزنمونه‌های ارقام مختلف فندق به سطوح مختلف BAP متفاوت است. به‌طوری‌که در رقم روند، با افزایش غلظت BAP به ۲، ۳، ۵ و ۸ میلی‌گرم در لیتر هیچ گونه رشدی در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد. ولی در ارقام گرد و فرتیل رشد و شاخه‌دهی ریزنمونه‌ها در سطوح ۲ و ۸ میلی‌گرم در لیتر BAP نیز اتفاق افتاد. برخلاف رقم روند، ریزنمونه‌های ارقام گرد و فرتیل در محیط‌کشت فاقد BAP رشد نکردند (جدول ۲).

در ریزنمونه‌های فصول پاییز و تابستان رقم فرتیل محیط کشت‌های حاوی ۳ یا ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین درصد شاخه‌دهی (۷۷/۳۳ درصد) را نشان دادند. درحالی‌که ریزنمونه‌های بهار این رقم در محیط‌های کشت حاوی ۳ یا ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP از درصد شاخه‌دهی کمتری برخوردار بودند (جدول ۲ و شکل ۵). در محیط‌کشت فاقدBAP هیچ‌کدام از ریزنمونه‌های کشت شده رشد نکردند (شکل ۵). این تفاوت در پاسخ جوانه‌های فصول مختلف سال را می‌توان به شرایط فیزیولوژیکی متفاوت ریزنمونه‌ها و همچنین میزان هورمون‌های داخلی بافت‌ها و اندام‌های گیاه در دوره‌های مختلف رشدی نسبت داد. به‌طوری‌که، بررسی هورمون‌های داخلی در دوره‌های مختلف سال نشان داده که بافت‌های در حال رشد فندق دارای سطوح بالایی از IBA (ایندول ۳-استیک‌اسید) و زاتین و N^6–[2 2-iP (Isopentenyl] adenine– هستند. میزان این هورمون‌های داخلی می‌تواند رشد و ریخت‌زایی درون‌شیشه‌ای اندام‌ها و بافت‌ها را تحت تأثیر قرار دهد *داویس*؛ *اندرس* و همکاران؛ *باچتا* و همکاران، 2008 (Davies, 1995; Anders *et al*., 2002).

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۶-۷ متن انگلیسی مراجعه شود.