مجله علمی ترویجی گل و گیاهان زینتی (۱۳۹۵)، ۱(۲): ۸۵- ۹۵

# عوامل مؤثر بر پدیده شیشه‌ای شدن بافت گیاهی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای و راهکارهای مقابله با آن

## مطالعه موردی: گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

خرازی سیده مهدیه[۱*]، تهرانی‌فر علی[۲]، نعمتی سیدحسین[۲]، باقری عبدالرضا[۳]، شریفی احمد[۱]

۱. گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد

۲. گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* ma_kh230@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰۹/۲، تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹٤/۱۲/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۷

**چکیده**

پدیده شیشه‌ای شدن ناشی از تغییرات نامطلوب فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در بافت گیاهی است. در بافت‌های شیشه‌ای شده تعداد دسته‌جات آوندی، سلول‌های روزنه و سلول‌های کوتیکول برگ کاهش می‌یابد و واکوئل‌ها در سلول‌های مزوفیل برگ حجیم می‌شوند. عوامل متعددی بر پدیده شیشه‌ای شدن موثر می‌باشد که از مهم‌ترین این عوامل نوع تنظیم کننده‌ی رشد، نوع و غلظت سیتوکینین، نسبت یون نیترات به آمونیوم در محلول غذایی، نوع و مقدار آگار، تهویه و تعداد دفعات واکشت می‌باشد. افزایش غلظت آگار به علت کاهش رطوبت محیط کشت باعث کاهش این پدیده می‌گردد. درحالیکه افزایش غلظت هورمون سیتوکینین و کاهش نسبت یون نیترات به آمونیوم در محیط کشت باعث افزایش آن می‌شود. حضور هورمون BA نسبت به سایر سیتوکینین‌ها و همچنین فیتازل نسبت به سایر انواع آگار باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شوند. استفاده از درپوش پارافیلم به علت افزایش تبادلات گازی باعث کاهش تجمع اتیلن و در نتیجه کاهش میزان شیشه‌ای شدن می‌گردد. کاربرد سیستم سرمادهی از کف می‌تواند باعث کاهش فعالیت تمامی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گردد و منجر به کاهش میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌ها می‌گردد. لذا با توجه به نتایج گزارش شده، جهت کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن در شرایط درون شیشه‌ای، کاربرد سیتوکینین با غلظت‌های پایین‌تر، جایگزین نمودن BA با سایر سیتوکینین‌های رایج و در صورت لزوم کاربرد غلظت‌های پایین BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، استفاده از درپوش پارافیلم، افزایش غلظت آگار تا حد قابل قبول (۱۰ گرم در لیتر)، کاربرد سیستم سرمادهی از کف، کاهش تعداد دفعات واکشت تا حد امکان و سازگار نمودن هرچه سریعتر گیاهچه‌های کشت بافتی پیشنهاد می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** تعداد دفعات واکشت، شیشه‌ای شدن، غلظت آگار، نسبت آمونیوم به نیترات، نوع درپوش، نوع تنظیم کننده‌ی رشد.



[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]

[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]

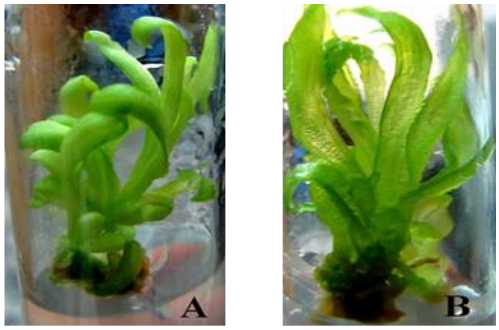
[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

## مقدمه

در کشت درون‌شیشه‌ای علی رغم کنترل نسبی بسیاری از عوامل موثر در رشد، باز هم شرایط تنش وجود دارد. چگونگی برش ریزنمونه، ترکیب مواد هورمونی در محیط‌کشت، نوع آگار، ترکیبات محیط‌کشت پایه و مقدار آب محیط‌کشت همه از عوامل ایجاد تنش می‌باشند. یکی از عوارضی که در شرایط درون‌شیشه‌ای در اثر تنش ایجاد می‌شود، پدیده شیشه‌ای شدن[1] می‌باشد. این پدیده ناشی از تغییرات نامطلوب فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در بافت گیاهی است. در بافت‌های شیشه‌ای شده تعداد دسته‌جات آوندی، سلول‌های روزنه و سلول‌های کوتیکول برگ کاهش می‌یابد و واکوئل‌ها در سلول‌های مزوفیل برگ حجیم می‌شوند. در این گیاهان برگ‌ها پهن، ضخیم، ترد و شکننده شده، ظرفیت فتوسنتزی آنها کم شده و در نتیجه احتمال زنده‌مانی این گیاهان پس از انتقال به شرایط طبیعی کاهش می‌یابد. شیشه‌ای شدن می‌تواند در شدت‌های مختلف اتفاق افتد. ساقه‌های به شدت شیشه‌ای شده نیمه شفاف می‌باشند در حالی که ساقه‌های سفید با سطح متوسط شیشه‌ای دارای ظاهری مرطوب هستند (Leshem 1983).

## علائم فیزیومورفولوژیک پدیده شیشه‌ای شدن

شیشه‌ای شدن یکی از مشکلات متداول طی فرآیند کشت بافت میخک می‌باشد. این فرآیند در واقع ایجاد نوعی تغییرات نامطلوب فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در بافت‌های گیاهی است (شکل ۱) که با علائم مورفولوژیکی نظیر برگ‌های ضخیم و شفاف و تغییرات فیزیولوژیکی مانند هیپرتروفی[2] پارانشیم مغزی، کاهش سلول‌های نردبانی میانبرگ، کاهش تعداد دسته‌جات آوندی، اپیدرم ناقص، مقدار موم، کوتین، پکتین و سلولز اندک، روزنه‌های غیر عادی و کلروپلاست کم کلروفیل قابل تشخیص است. در گیاهان شیشه‌ای شده تعداد سلول‌های روزنه و سلول‌های کوتیکول برگ کاهش می‌یابد و سلول‌های مزوفیل برگ دارای واکوئل حجیمی می‌شوند. در این گیاهان برگ‌ها پهن، ترد و شکننده می‌باشند و ظرفیت فتوسنتزی آنها کاهش می‌یابد و در نتیجه احتمال زنده‌مانی این گیاهان پس از انتقال به شرایط محیطی طبیعی کاهش می‌یابد (Yadav *et al*. 2003; Hazarika & bora 2010).




**شکل ۱**- مقایسه مورفولوژیک گیاهچه سالم (A) و گیاهچه شیشه‌ای شده میخک (B).

## عوامل موثر بر پدیده شیشه‌ای شدن

عوامل متعددی بر پدیده شیشه‌ای شدن در شرایط درون‌شیشه‌ای موثر می‌باشند که با کنترل این عوامل می‌توان میزان این عارضه را در طی مراحل ریزازدیادی به میزان زیادی کاهش داد. از جمله مهم‌ترین این عوامل به شرح ذیل می باشند:

۱. میزان رطوبت نسبی درون ظروف‌کشت: کاهش میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت از ۹۸٪ به ۷۰٪ منجر به کاهش میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه ها از ۷۰٪ به ۹٪ گردید و همچنین باعث افزایش وزن خشک بافت سالم از ۱۶٪ به ۲۵٪ گردید (Correll & Weathers 2001).

[1]- Vitrification (Hyperhydricity)
[2] - Hypertrophy

۲. تعداد دفعات واکشت: با افزایش تعداد دفعات واکشت، شیشه‌ای شدن به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد و هنگامی که واکشت گیاهان در محیط کشت موراشی و اسکوگ (MS) بیش از دو بار متوالی صورت گیرد، میزان رخداد این عارضه تشدید می‌شود (Vieitez *et al*. 1985؛ خرازی و همکاران، ۱۳۹۱ الف).

۳. میزان دی اکسید کربن درون ظروف کشت: افزایش میزان $co_2$ درون ظروف کشت از ۴۵۰ به ۱۳۵۰ پی پی ام، همراه با افزایش شدت نور، باعث کاهش رخداد پدیده شیشه‌ای شدن از ۷۵٪ به ۲۵٪ گردید (Correll & Weathers 2001).

۴. تهویه: گزارشات متناقضی مبنی بر تاثیر مطلوب درپوش‌هایی نظیر درپوش پنبه ای، سلفون و پارافیلم وجود دارد (Winarto *et al*. 2004؛ خرازی و همکاران، ۱۳۹۱ الف).

۵. نوع تنظیم‌کننده رشد: کاربرد سیتوکینین‌ها باعث افزایش و کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک باعث کاهش میزان این عارضه می‌گردد (Ashnayi *et al*. 2012; Jain *et al*. 2001 ; خرازی و همکاران، ۱۳۹۱ ج).

۶. نوع و غلظت هورمون سیتوکینین: کاربرد هورمون BA نسبت به سایر انواع سیتوکینین‌ها باعث تشدید پدیده شیشه‌ای می‌گردد و غلظت‌های بالای سیتوکینین نظیر ۴ میلی گرم در لیتر نیز این پدیده را تشدید می‌کند (Hazarika & Bora 2010؛ خرازی و همکاران، ۱۳۹۰ ب).

۷. نوع و غلظت آگار: کاربرد آگار Type 900 در مقایسه با باکتوآگار[3] و فیتاژل[4] میزان شیشه‌ای شدن را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. همچنین برای بدست آوردن بیشترین شاخه طبیعی، غلظت ۱۰ گرم درلیتر آگار برای کشت درون شیشه‌ای میخک مناسب گزارش شده است (Winarto *et al*. 2004 ؛ خرازی و همکاران، ۱۳۹۱ ب).

۸. نسبت آمونیوم به نیترات در محیط کشت: کاهش نسبت آمونیوم به نیترات در محیط‌کشت پدیده شیشه‌ای شدن را کاهش می‌دهد (Tsay, 1998؛ خرازی و همکاران، ۱۳۹۱ ب).

۹. شدت نور: افزایش میزان شدت نور از ۶۵ به ۱۴۵ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه همراه با افزایش غلظت دی اکسید کربن، منجر به افزایش میزان وزن خشک بافت‌های سالم از ۱۷٪ به ۲۵٪ گردیده است (Correll & Weathers 2001;؛ Ziv 1986).

۱۰. سرمادهی از کف[5]: کاربرد سیستم سرمادهی از کف در کشت درون شیشه‌ای میخک، باعث کاهش قابل توجهی در تعداد شاخساره‌های شیشه‌ای شده گردید (Saher *et al*. 2005).

## نوع تنظیم‌کننده رشد

نوع تنظیم‌کننده رشد از مهم‌ترین عوامل موثر در میزان رخداد این پدیده می‌باشد که در مطالعات مختلف به این عامل توجه زیادی شده است. در اکثر گزارش‌های موجود، از ترکیبات هورمونی مختلف چون سیتوکینین‌ها به خصوص هورمون بنزیل‌آدنین به تنهایی یا همراه با اکسین جهت پُرآوری ریزنمونه‌ها از طریق روش باززایی مستقیم استفاده گردیده است و کمتر به کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک در روش باززایی مستقیم اشاره شده است (Fayek *et al*. 2009; Ali *et al*. 2008;). این در حالی است که کاربرد هورمون بنزیل آدنین در ترکیب

[3] - Bacto Agar
[4] - Phytagel
[5]- Bottom cooling



[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]
[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

محیط‌کشت باعث کاهش فاصله میانگره و ارتفاع گیاهچه باززایی شده و در نتیجه افزایش پدیده شیشه‌ای شدن و کاهش درصد تولید گیاهان سالم می‌گردد (Paques 1991; Hazarika & Bora 2010؛ خرازی و همکاران، ۱۳۹۰ ب). تاثیر هورمون اسیدجیبرلیک در شرایط برون شیشه‌ای به‌طور وسیعی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است اما در شرایط درون‌شیشه‌ای به ندرت از این هورمون استفاده شده است (Dagnino *et al*. 1991). از آنجایی که هورمون اسیدجیبرلیک میزان رشد طولی و فاصله میانگره را افزایش می‌دهد، بنابراین می‌توان انتظار داشت که در کاهش پدیده شیشه‌ای شدن در کشت مریستم موثر واقع گردد. Jain و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک تاثیر مطلوبی بر کاهش پدیده شیشه‌ای شدن داشت و کاربرد آن بر گیاهچه‌های میخک شیشه‌ای شده، باعث برطرف شدن این پدیده شد. این در حالی است که Kim و همکاران (۱۹۸۸) گزارش کردند که کاربرد هورمون اسیدجیبرلیک میزان رشد را افزایش می‌دهد ولی تاثیری بر کاهش میزان شیشه‌ای شدن و افزایش تشکیل گیاهچه‌های سالم ندارد. در پژوهش دیگری که توسط Jain و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر ریزنمونه‌های نوک شاخساره گیاه میخک صورت گرفت، مشخص گردید که عدم کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌کشت سبب افزایش تشکیل تعداد شاخساره‌های سالم می‌شود، این در حالی است که محیط‌کشت حاوی BA منجر به شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌گردد. نتایج پژوهش آنها نشان داد که کاربرد محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک توانست میزان شیشه‌ای شدن را تا حدود زیادی کاهش دهد ولی برطرف شدن کامل این پدیده در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک و یا محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک همراه با ۵ گرم در لیتر باکتوپپتون[6] مشاهده شد.

در پژوهشی Ashnayi و همکاران (۲۰۱۲) تاثیر نوع تنظیم کننده رشد را بر روی کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های مریستم میخک مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که محیط کشت حاوی $GA_3$، نسبت به محیط‌کشت حاوی BA شاخساره‌های بلندتر و مناسب‌تری را برای برش نوک مریستم فراهم می‌کند و درعین‌حال میزان شیشه‌ای شدن نوک مریستم‌های کشت شده در محیط‌کشت حاوی $GA_3$ کمتر از محیط‌کشت حاوی BA می‌باشد.

**نوع و غلظت هورمون سیتوکینین**

نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شود (Kharrazi *et al*, 2011a; Hazarika & Bora 2010; Paques 1991 ; خرازی و همکاران، ۱۳۹۰ ب). حضور هورمون BA در محیط‌کشت عامل مهمی در ایجاد پدیده شیشه‌ای شدن می‌باشد، به‌طوری که با کاهش میزان این هورمون پدیده شیشه‌ای شدن نیز کاهش می‌یابد، در عین حال میزان تکثیر و باززایی نیز کاهش می‌یابد (Leshem 1988). Sharma و Mohan (۲۰۰۶) نیز بیان کردند که کاربرد هورمون Kin نسبت به BA میزان پدیده شیشه‌ای شدن را کاهش می‌دهد و با افزایش غلظت هر دو نوع هورمون، پدیده شیشه‌ای شدن افزایش می‌یابد. Tsay (۱۹۹۸) با بررسی پاسخ ریزنمونه‌های جوانه انتهایی میخک نسبت به غلظت‌های مختلف هورمون BA نتیجه گرفت که با افزایشغلظت هورمون BA از ۰ به ٤ میلی‌گرم در لیتر، میزان شاخه‌زایی افزایش می‌یابد ولی غلظت بالای هورمون BA باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن نیز می‌شود. Dencso (۱۹۸۷) اظهار داشت که افزایش غلظت هورمون کینتین از ۱ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، باعث افزایش درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها از ۱۹٪ به ٦٥٪ می‌شود. اگرچه کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA یا 2ip باعث

[6] - Bactopeptone



[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]
[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

افزایش تعداد شاخساره می‌شود اما گیاهان حاصله ظاهری غیرطبیعی خواهند داشت. نتایج پژوهش خرازی و همکاران (۱۳۹۱ ب) بر روی کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی چهار ژنوتیپ میخک نشان داد که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین از ۱ به ٤ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش تعداد شاخساره باززایی شده از ۱/۷ به ۲/٤ شاخه در هر ریزنمونه گردید. همچنین با افزایش میزان این هورمون، شیشه‌ای شدن از ۱۲ درصد به ٥٤ درصد افزایش یافت.

Leshem (۱۹۸۸) نشان داد که پدیده شیشه‌ای شدن در حضور هورمون سیتوکینین اتفاق می‌افتد و زمانی‌که سایر عوامل موثر بر پدیده شیشه‌ای شدن نظیر غلظت پایین آگار، رطوبت نسبی بالا و غلظت زیاد یون آمونیوم حضور داشته باشند، در صورت عدم حضور هورمون سیتوکینین، پدیده شیشه‌ای شدن تحریک نمی‌شود. نتایج پژوهش Phan (۱۹۹۱) نیز نشان داد که چنانچه حجم اتیلن در ظروف کشت بالا باشد و یا محیط کشت مایع جهت کشت ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد، پدیده شیشه‌ای شدن تحریک نمی‌شود. بلکه حضور هورمون BA در محیط کشت است که این پدیده را تحریک می‌کند.

**نسبت آمونیوم به نیترات در محیط‌کشت**

نسبت آمونیوم به نیترات نیز به‌عنوان یک عامل کلیدی در رشد گیاهان مختلف مطرح است (Lapena *et al.* 1992). گزارش‌های متناقضی در ارتباط با تاثیر نسبت آمونیوم به نیترات بر میزان پُرآوری وجود دارد، به‌طوریکه برخی از محققان گزارش کرده اند که با کاهش میزان آمونیوم محیط‌کشت می‌توان میزان پُرآوری را افزایش داد (Curir *et al.* 1986). این درحالی است که نتایج پژوهش سایر محققان نشان می‌دهد که بهترین محیط‌کشت از نظر پُرآوری، محیط‌کشت پایه MS بدون تغییر در نسبت آمونیوم به نیترات می‌باشد (Davies 1980). نتایج پژوهش Tsay (۱۹۹۸) نشان داد که تنها در واکشت چهارم میخک، افزایش نسبت نیترات به آمونیوم باعث کاهش پدیده شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها شده و تاثیر معنی‌داری بین تیمارها در واکشت اول مشاهده نشد. Lapena و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که کاهش نسبت آمونیوم به نیترات در محیط‌کشت نه تنها توانایی تشکیل جوانه را افزایش می‌دهد، بلکه میزان پدیده شیشه‌ای شدن را نیز کاهش می‌دهد. نتایج پژوهش خرازی و همکاران (۱۳۹۱ ب) نشان داد که کاهش نسبت آمونیوم به نیترات در محیط کشت، باعث کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن و افزایش پُرآوری می‌گردد. این گروه بهترین نسبت آمونیوم به نیترات را نسبت ۱ به ٦ (٦:۱) گزارش کردند.

**نوع و غلظت آگار**

برخی پژوهشگران با تغییر در غلظت آگار محیط کشت، کاهش پدیده شیشه‌ای شدن را گزارش کرده‌اند (Lapena *et al.* 1992; Ziv & Ariel 1992؛ خرازی و همکاران، ۱۳۹۱ ب). نتایج بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت آگار پدیده شیشه‌ای شدن کاهش می‌یابد اما در عین حال تاثیر نامطلوبی بر جذب عناصر غذایی و هورمون‌های موجود در محیط‌کشت داشته و باعث کاهش رشد گیاهچه‌ها می‌شود (Bornman & Vogelman 1984).

خرازی و همکاران (۱۳۹۱ ب) گزارش کردند افزایش غلظت آگار سبب کاهش میزان شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های تکثیر شده می‌گردد ولی درعین حال میزان پُرآوری شاخه‌ها را نیز کاهش می‌دهد. گیاهچه‌های شیشه‌ای شده به علت رشد غیر طبیعی، درصد زنده‌مانی کمی دارند و طی مراحل سازگاری از بین می‌روند. لذا در مراحل پُرآوری، توجه به میزان شاخه تکثیرشده و درصد شیشه‌ای شدن آنها اهمیت زیادی دارد. آنها همچنین بیان کردند که با درنظر گرفتن



[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]
[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

میزان شاخه‌زایی و میزان شیشه‌ای‌شدن آنها، برای بدست آوردن بیشترین شاخه طبیعی، غلظت ۱۰ گرم‌درلیتر آگار برای کشت درون شیشه‌ای میخک رقم Mondeo Kgr مناسب می‌باشد.

Winarto و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند که کاربرد آگار Type 900 در مقایسه با باکتوآگار و فیتاژل میزان شیشه‌ای شدن را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. نتایج پژوهش Yadav *et al.* (2003) نشان داد که رقم، تاثیر معنی‌داری بر میزان پدیده شیشه‌ای شدن دارد، به‌طوریکه در رقم White Sim، با کاهش غلظت آگار به ٦ گرم در لیتر، پدیده شیشه‌ای شدن رخ نداد. درصورتی که در سایر ارقام میزان این پدیده قابل توجه بود. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که ارقام مختلف میخک عکس‌العمل متفاوتی نسبت به تغییر غلظت آگار در محیط‌کشت از خود نشان می‌دهند و سطح بهینه آگار جهت افزایش پُرآوری و کاهش میزان شیشه‌ای شدن برای ارقام مختلف میخک، متفاوت می‌باشد.

**تهویه**

تغییر در شرایط محیطی کشت مانند خنک‌سازی، تهویه و سیستم‌های هوادهی باعث کاهش پدیده شیشه‌ای‌شدن می‌شود (Debergh & Vanderschaeghe 1990). همچنین تهویه مناسب باعث کاهش تجمع گازهایی نظیر اتیلن و دی اکسیدکربن در ظروف کشت می‌گردد که این گازها در پدیده شیشه‌ای شدن موثر می‌باشند (Jackson *et al.* 1991). Rossetto و همکاران (۱۹۹۲) بیان کردند با هوادهی و تهویه مناسب در محیط‌کشت می‌توان کشت‌بافت بسیاری از گیاهان، به‌خصوص گیاهان حساس به پدیده شیشه‌ای شدن را بهبود بخشید. نتایج تحقیق آنها نشان داد که با کاربرد این روش ساده و موثر می‌توان شاهد کاهش میزان شیشه‌ای شدن، افزایش کیفیت شاخساره‌های تکثیریافته و افزایش سازگاری گیاهان پس از انتقال به محیط طبیعی بود. نتایج پژوهش Casanova و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که نوع درپوش بر میزان رطوبت نسبی درون ظروف کشت تاثیرگذار است و چنانچه درپوشی مورد استفاده قرار گیرد که باعث شود تهویه به‌خوبی صورت گیرد، شیشه‌ای شدن به میزان قابل توجهی کاهش خواهد یافت. Winarto و همکاران (۲۰۰٤) تاثیر درپوش‌های فویل‌آلومینیومی، پنبه‌ای، سلفونی و پارافیلم را بر کشت درون‌شیشه‌ای میخک بررسی کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که درپوش سلفونی بهترین تاثیر را در کاهش میزان شیشه‌ای شدن داشت. این درحالی است که نتایج پژوهش Hakkaart و Versluijs (۱۹۸۳) نشان داد که کاربرد درپوش پنبه‌ای نسبت به فویل‌آلومینیومی و یا پارافیلم در کاهش این پدیده موثرتر است. خرازی و همکاران (۱۳۹۱ الف) بیان کردند که گیاهان باززایی شده در تیمار درپوش سلفون و کاغذی کیفیت مطلوبی نداشتند و به علت تبادلات گازی زیاد، این گیاهان رطوبت خود را به سرعت از دست دادند. اما کاربرد درپوش پارافیلم به علت داشتن تبادلات گازی مطلوب باعث افزایش باززایی گیاهچه‌ها و کاهش میزان شیشه‌ای شدن در حد مطلوب گردید.

**تعداد دفعات واکشت**

بیشترین گزارش در ارتباط با پدیده شیشه‌ای شدن، در محیط‌کشت MS گزارش شده است. زیرا این محیط‌کشت حاوی درصد بالایی از نیترات آمونیوم می‌باشد (Tsay 1998). علاوه براین هنگامی که واکشت گیاهان در محیط کشت MS بیش از دو بار متوالی صورت گیرد، میزان شیشه‌ای شدن تشدید می‌شود و همزمان با افزایش شیشه‌ای شدن، میزان لیگنینی شدن بافت ها نیز کاهش می‌یابد (Vieitez *et al.* 1985). Tsay (۱۹۹۸) تاثیر تعداد دفعات واکشت را بر ریزنمونه‌های نوک شاخساره میخک بررسی کرد. نتایج پژوهش وی نشان داد که تعداد دفعات واکشت



[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]

[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

تاثیر معنی‌داری بر میزان شیشه‌ای شدن داشت به‌طوریکه با افزایش تعداد دفعات واکشت، شیشه‌ای شدن به میزان قابل توجهی افزایش یافت. خرازی و همکاران (۱۳۹۱ الف) در پژوهشی تاثیر تعداد دفعات واکشت را بر ریزازدیادی و میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های جوانه جانبی دو رقم میخک مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که انتخاب مناسب‌ترین تعداد دفعات واکشت وابسته به ژنوتیپ است و رقم Mondeo Kgr در واکشت اول بیشترین شاخساره سالم و رقم Prado Aquila Kgr در واکشت دوم بیشترین شاخساره سالم را تولید نمود.

## سرمادهی از کف

بهبود شرایط محیطی در کشت درون شیشه‌ای، از طریق سیستم سرمادهی از کف می‌تواند از تنش‌های مختلف که در نهایت منجر به شیشه‌ای شدن می‌گردند، به میزان زیادی جلوگیری نماید. بدین منظور طی پژوهشی تاثیر سیستم سرمادهی از کف و غلظت‌های مختلف آگار (۰/۸۵ و ۰/۵۸ درصد) بر میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌های میخک مورد ارزیابی قرار گرفت. در طی ۲۸ روز دوره کشت، میزان رطوبت نسبی، میزان شیشه‌ای شدن، وزن خشک، سرعت تکثیر، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تحت تاثیر غلظت آگار و سیستم سرمادهی از کف قرار گرفت. در هر دو غلظت آگار مورد استفاده، کاربرد سیستم سرمادهی از کف باعث کاهش قابل توجهی در تعداد شاخساره‌های شیشه‌ای شده گردید. در سیستم سرمادهی از کف، میزان پراکسیداسیون لیپیدها در شاخساره‌های کشت شده میخک، در مقایسه با سیستم شاهد کمتر بود. همچنین فعالیت تمامی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در سیستم سرمادهی از کف در مقایسه با شاهد کمتر بود. نتایج نشان می‌دهد که کاهش میزان تولید $H_2O_2$ در سیستم سرمادهی از کف می‌تواند تنش‌های اکسیداتیو را به میزان زیادی کاهش دهد و در نتیجه بر میزان شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها نیز تاثیرگذار است (Saher *et al.* 2005).

## استفاده از باکتری سودوموناس در محیط‌کشت

نتایج پژوهش برخی از محققین نشان می‌دهد که کاربرد باکتری سودوموناس[7] در محیط‌کشت، می‌تواند میزان پدیده شیشه‌ای شدن را کاهش دهد. به‌عنوان مثال در گیاهانی مانند انیسون (Bela *et al.* 1998)، پونه کوهی (Shetty *et al.* 1995;Ueno & Shetty 1998)، تمشک (Ueno *et al.* 1998) و سیب‌زمینی (Nowak *et al.* 1998) استفاده از این باکتری جهت کاهش پدیده شیشه‌ای شدن گزارش شده است. نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که کاربرد باکتری سودوموناس در محیط‌کشت سبب کاهش محتوای رطوبت بافت و افزایش میزان کلروفیل می‌گردد و بدین طریق علایم پدیده شیشه‌ای شدن نیز کاهش می‌یابد. این در حالی است که خرازی و همکاران (۱۳۹۰ الف) گزارش کردند که تمامی ریزنمونه‌های تیمارشده با باکتری سودوموناس پس از گذشت چند روز علائم آلودگی باکتریایی را از خود نشان دادند و ریزنمونه‌ها بطور کامل از بین رفتند. با توجه به اینکه گزارشات مربوط به کاربرد باکتری سودوموناس در محیط‌کشت توسط محققان محدودی گزارش شده است و تنها در ارتباط با گیاهان اندکی می‌باشد، همچنین از سوی دیگر زمان انتشار آنها تنها محدود به سال های ۱۹۹۵ تا ۱۹۹۸ می‌باشد و پس از آن ادامه این تحقیقات بر روی سایر گیاهان متوقف شده است، بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از این راهکار جهت کاهش پدیده شیشه‌ای شدن چندان راهگشا و موثر نمی‌باشد.

## نتیجه‌گیری

عوامل متعددی بر پدیده شیشه‌ای شدن موثر می‌باشد که از مهم‌ترین این عوامل نوع تنظیم کننده‌ی رشد، نوع و غلظت

[7]- *Pseudomonas* sp.



[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]
[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

سیتوکینین، نسبت یون نیترات به آمونیوم در محیط کشت، نوع و غلظت آگار، تهویه و تعداد دفعات واکشت می باشند. افزایش غلظت آگار به علت کاهش رطوبت محیط کشت، باعث کاهش این پدیده می‌شود. در صورتی که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین و کاهش نسبت نیترات به آمونیوم در محیط کشت باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شود. حضور هورمون BA نسبت به سایر سیتوکینین‌ها و همچنین فیتاژل نسبت به سایر انواع آگار باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شوند. استفاده از درپوش پارافیلم به علت افزایش تبادلات گازی باعث کاهش تجمع اتیلن و در نتیجه کاهش میزان شیشه‌ای شدن می‌شود. بنابراین می‌توان با کنترل عوامل موثر بر شیشه‌ای شدن، تا حد مطلوبی از وقوع این پدیده در کشت درون شیشه‌ای جلوگیری کرد.

## دستورالعمل ترویجی

لذا با توجه به نتایج گزارش شده، جهت کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن در شرایط درون شیشه‌ای موارد ذیل پیشنهاد می شود:

۱. کاربرد سیتوکینین با غلظت‌های پایین‌تر
۲. جایگزین نمودن هورمون BA با سایر سیتوکینین‌های رایج و درصورت لزوم کاربرد غلظت‌های پایین BA (۰/۵ میلی گرم در لیتر)
۳. استفاده از درپوش پارافیلم
٤. افزایش غلظت آگار تا حد قابل قبول (۱۰ گرم در لیتر)
۵. کاربرد سیستم سرمادهی از کف
٦. کاهش تعداد دفعات واکشت تا حد امکان
۷. سازگار نمودن هرچه سریعتر گیاهچه‌های کشت بافتی

## منابع


خرازی م، نعمتی ح، تهرانی‌فر ع، باقری ع و شریفی ا (۱۳۹۰ الف). بررسی اثر نوع ریزنمونه، رقم، تنظیم‌کننده‌های رشد و ترکیبات محیط کشت بر کشت درون‌شیشه‌ای میخک. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

خرازی م، نعمتی ح، تهرانی‌فر ع، باقری ع و شریفی ا (۱۳۹۰ب). بررسی اثرات نوع و غلظت سیتوکنین بر تکثیر درون شیشه‌ای و میزان شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های چهار ژنوتیپ میخک (*Dianthus caryophyllus* L.). مجله علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد: ۲۵(٤): ۳۷٦-۳۸۳.

خرازی م، نعمتی ح، تهرانی‌فر ع، باقری ع، شریفی ا (۱۳۹۱ الف). بررسی اثر نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر باززایی مستقیم میخک (*Dianthus caryophyllus* L.). مجله فن‌آوری زیستی دانشگاه بوعلی سینا همدان، ۱۱(۱): ۳۵-٤۰.

خرازی م، نعمتی ح، تهرانی‌فر ع، باقری ع، شریفی ا (۱۳۹۱ ب). بررسی اثر نسبت آمونیوم به نیترات و غلظت آگار بر کشت درون شیشه‌ای میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) رقم Mondeo Kgr. مجله علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲٦(٤): ۳٦٤-۳٦۹.

خرازی م، نعمتی ح، تهرانی‌فر ع، باقری ع، شریفی ا (۱۳۹۱ ج). بهینه سازی شرایط کشت نوک شاخساره میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) در شرایط درون شیشه ای. مجله فناوری زیستی دانشگاه بوعلی سینا همدان، ۱۲(۱): ۱۱-۱۹.

Ali A, Afrasiab H, Naz S, Rauf M, Iqhbal J (2008). An efficient protocol for in vitro propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Pakistan J Bot. 40: 111-121.

Ashnayi M, Kharrazi M, Sharifi A, Mehrvar M (2012). Carnation etched ring virus elimination through shoot tip culture. JBES. 6(17): 175-180.




[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]
[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

Bela J, Ueno K, Shetty K (1998). Control of hyperhydricity in Anise (*pimpinella anisum*) tissue culture by Pseudomonas spp. J Herbs Spices Med Plants. 6: 57-67.

Bornman CH, Vogelman TC (1984). Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formationand and vitrification *in vitro* in *picea abies*. Physiol. Plant. 61:505-512.

Casanova E, Moyyset L, Trillas MI (2008). Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. Biol Plantarum. 52: 1-8.

Correll MJ, Weathers PJ (2001). Effect of light, co2 and humidity on carnation growth, hyperhydration and cuticular wax development in a mist reactor. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 37:405-413.

Curir P, Damiano C, Cosmi T (1986). *In vitro* propagation of some rose cultivars. Acta Hort. 189: 221-224.

Dagnino DS, Carelli MLD, Arrabal RF, Esquibel MA (1991). Effect of gibberellic acid on *Ipomoea batatats* regeneration from meristem culture. Pesq Agropec Bras Brasflia. 26: 259-262.

Davies DR. (1980). Rapid propagation of rose. Sci Hort. 13: 385-389.

Debergh P, Vanderschaeghe A (1990). Mass propagation of *in vitro* plantlets. Chron Horticult. 30:1-2.

Dencso I (1987). Factor influencing vitrification of carnation and conifers. Acta Hort. 212: 167-176.

Fayek MA, Jomaa AH, Shalaby AA, Al-Dhaher MA (2009). Meristem tip culture for *in vitro* eradication of grapevine leaf roll-associated virus-1(GLRaV-1) and grapevine fan leaf virus (GFLV) from infected flame seedless grapevine plantlets. Iniciacion a la investigation. 4:1-11.

Hakkaart FA, Versluijs JMA (1983). Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. Neth J Plant Pathol. 89:47-53.

Hazarika BN, Bora A. (2010). Hyperhydricity-a bottleneck to micropropagation of plants. Acta Hort. 865: 95-102.

Jackson MB, Abbott AJ, Belcher AR (1991). Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. Annals of Botany. 67:229-237.

Jain A, Hussain S, Kothari SL (1997). Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L. control of vitrifcation. J PLANT BIOCHEM BIOT. 6: 35-37.

Jain A, Kanita A, Kothari SL (2001). De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. Sci Hort. 87: 319-326.

Kallak H, Hilpus I, Virumae K. (1996). Influence of genotype and growth regulators on morphogenetic processes in carnation shoot apex culture. Sci Hort. 65: 181-189.

Kevers C, Gaspar T (1985). Vitrification of carnation *in vitro*: changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. Plant Cell Tiss Org. 4: 215-223.

Kharrazi M, Nemati H, Tehranifar A, Bagheri A, Sharifi A (2011a). *In Vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. JBES. 5(13): 159-164.

Kim KW, Byun MS, Kang MS (1988). Effects of ABA and agar in preventing vitrification of carnation plantlets cultured *in vitro*. J Korean Soc Hort Sci. 29: 208-215.

Lapena L, Perez-Bermudez P, Segura J (1992). Factors affecting shoot proliferation and vitrification in *Digitalis obscura* cultures. *In Vitro* Cell Dev B. 28:121-124.

Leshem B (1983). Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. Ann. Bot. 52: 413-415.

Leshem B (1988). Cytokinin: the primary inducer of vitrification. Agricell Report. 10: 46.

Nowak J, Asiedu SK, Bensalim S, Richards J, Stewart A, Smith C, Stevens D, Sturz AV (1998). From laboratory to applications: challenges and progress with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. Plant Cell Tiss Org. 52: 97-103.



[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]

[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

Paques M (1991). Vitrification and micropropagation: causes and prospects. Acta Hort. 289: 283-290.

Phan CT (1991). Vitrification: cause and prevention. Agricell report. 16: 21.

Rossetto M, Dixon KW, Bunn E (1992). Aeration: A simple method to control vitrification and improve *in vitro* culture of rare Australian plants. In Vitro Cell Dev-Pl. 28: 192-196.

Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2005). Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. Plant Cell Tiss Org. 81:149-158.

Sharma U, Mohan JSS (2006). Reduction of vitrification in *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borivilianum* Sant. & Fernand., a rare potent medicinal herb. Indian J Exp Biol. 44: 499-505.

Shetty K, Curtis OF, Levin RE, Witkowsky R, Ang W (1995). Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of oregano (*Origanum vulgare)* by *Pseudomonas* spp. J Plant Physiol. 147:447-451.

Tsay H (1998). Effect of medium composition at different recultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* shoot proliferation. Acta Hort. 461: 243-249.

Ueno K, Shetty K (1998). Prevention of hyperhydricity in oregano shoot cultures is sustained through multiple subcultures by selected polysaccharide-producing soil bacteria without re-inoculation. Appl Micribiol Biot. 50: 119-124.

Ueno K, Cheplick S, Shetty K (1998). Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. Process Biochem. 33: 441-445.

Vieitez AM, Ballester A, San-Jose C, Vieitez E (1985). Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. Physiol Plantarum. 65:177-184.

Winarto B, Aziz MA, Rashid AA, Ismail MR (2004). Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation. Indones J Agric Sci. 5: 11-19.

Yadav MK, Gaur AK, Garg GK (2003). Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. Plant Cell Tiss Org. 72: 153-156.

Ziv M (1986). *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. P. 187-196. In: LA Withers and PG Alderson (Eds.) Plant Tissue Culture and its Agricultural Application. Butterworth, London.

Ziv M (1991). Vitrification: morphological and physiological disorder of in vitro plants. P. 45-69. In: PC Debergh, and RH Zimmerman (Eds.) micropropagation; technology and application. Klumer Academic Publishers, London.

Ziv M, Ariel T (1992). On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. Acta Hort. 314: 121-129.

[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]

[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]

# Factors Affecting Plant Tissue Hyperhydricity at *in vitro* Culture and Strategies to Resolve it
## Case Study: (*Dianthus caryophyllus* L.)

Kharrazi Mahdiyeh[1]*, Tehranifar Ali[2], Nemati Hossein[2], Bagheri Abdol Reza[3], Sharifi Ahmad[1]

1. Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Mashhad, Iran
2. Department of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

* ma_kh230@yahoo.com

**Abstract**

Hyperhydricity is the development of an undesirable physiological and morphological change in plant tissue. In vitrified plants, the number of vascular bundles, stomata and cuticle cells are reduced and mesophyll cells contain massive vacuole. Several factors influence this phenomenon and the most important of these factors include: type of the plant growth regulator, type and concentration of cytokinin, ratio of ammonium to nitrate in the culture medium, type and concentration of agar, ventilation and number of subculturing. Increasing agar concentrations leads to decreasing this phenomenon due to reducing the moisture of culture medium. Increasing concentration of cytokinins and decreasing the ratio of nitrate to ammonium in the medium cause the occurrence of hyperhydricity. Presence of BA in compare to other types of cytokinins and also phytagel in compare to other type of gelling agent enhance the rate of hyperhydricity. Use of Parafilm cap decreases the amount of this phenomenon due to increasing gas exchange and decreasing accumulation of ethylene. The application of bottom cooling systems can reduce the activity of antioxidant enzymes and therefore cause reduction in the amount of hyperhydricity. By considering the reported results, to reduce the amount of hyperhydricity *in vitro*, using cytokinins with lower concentration, replacing BA with other commonly used cytokinins and if possible use lower concentrations of BA (0.5 mg/l), using Parafilm as vessel closure cap, increasing the concentration of agar to an acceptable level (10 g/l), using bottom cooling, reducing the frequency of sub-culturing as much as possible and acclimating tissue culture plantlets as soon as possible, is recommended.

**Key words:** Agar concentration, Number of subculturing, Ratio of ammonium to nitrate, Type of growth regulator, Vessel closure type.

[ Downloaded from flowerjournal.ir at 23:35 +0330 on Tuesday December 15th 2020 ]

[ DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.9.4 ]