The effect of time and different concentrations of sodium hypochlorite, carbendazim fungicide and mercuric chloride in inhibiting the contamination of *Fritillaria* spp. bulbs *(Fritillaria* spp.*)* in tissue culture environment

‹ Latefat Moradi*[1]Sayyed Najmmddin Mortazavi [2], Mitra alaei[3]

Introduction

Success in tissue culture technique, especially in bulbous plants, depends on the microbial contamination control during in vitro culture. Decontamination is considered as a fundamental challenge in the technique of cell, tissue and plant organ culture. Although there are various methods for this purpose, the development of disinfection methods specific to each species is considered an important factor in the establishment and success of the tissue culture system. Applying different treatments can control the microbial contamination and consequently increase the percentage of explant survival.

Materials and Methods

This study aimed to investigate the effect of time and different concentrations of sodium hypochlorite, carbendazim fungicide and mercuric chloride in inhibiting the contamination of inverted tulip bulbs *(Fritillaria* spp.*)* in tissue culture environment. So, an experiment was done as a completely randomized design at four replications in the biotechnology laboratory of Zanjan University during 2023. The experimental treatments consisted of 0.1% fungicide at different times (30, 25, 35 and 40 minutes), 5 levels of sodium hypochlorite (0,1, 1.5, 2, 2.5 and 3%) at different times (7, 9, 10, 12 and 15 minutes), 70% Ethanol at two different times (0,60 and 90 seconds) and mercury chloride (0,0.1 and 0.2%). Bulbs that collected from nature were transferred to the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Zanjan University and kept them in the refrigerator at 4°C for two weeks. After this period of time, the bulbs were washed with detergent and then remained in water for 30 minutes. Then they were disinfected by using the above-mentioned treatments: It should be noted that at the end of each step, *Fritillaria* bulbs were washed with sterile distilled water. Also, after the end of the disinfection treatments, the desired explants were cultured in MS basic culture medium. The statistical analysis of this experiment was carried out using SAS software, version 9.1. The differences between mean values were compared using Duncan's multiple range test method at the 5% significant level ($p < 0.05$).

Results and Discussion

The results of the present study showed that, despite of the fact that the lowest percentages of contamination were achieved in 40 minutes of carbendazim fungicide, 70% alcohol in 90 seconds, 3% concentration and 15 minutes of sodium hypochlorite and 0.2% mercury chloride concentration. But the survival rate of explants decreased to the lowest level and caused the explants to turn brown. According to the results, the best treatment with 80% decontamination and high survival rate were: 30 minutes of fungicide, 60 seconds of 70%

alcohol, 2% and 2.5% sodium hypochlorite (for 12 and 10 minutes respectively) and 0.1% mercuric chloride for 7 minutes. Therefore, it is suggested to use the mentioned treatments for *in vitro* cultivation conditions to reduce the contamination and micropropagation of *Fritillaria* Spp. bulbs.

نسخه پیش انتشار

تاثیر زمان و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم، قارچ‌کش کاربندازیم و کلرید جیوه در مهار آلودگی پیاز لاله واژگون (*Fritillaria* spp.) در محیط کشت بافت

لطافت مرادی،سید نجم الدین مرتضوی*، میترا اعلایی

***- mortazavi46@gmail.com**

چکیده

رفع آلودگی به‌عنوان یک چالش اساسی در تکنیک کشت سلول، بافت و اندام گیاهی به شمار می‌رود. با اینکه روش های مختلفی برای این منظور وجود دارد اما توسعه روش‌های ضدعفونی مختص هر گونه یک عامل مهم در استقرار و موفقیت سیستم کشت بافت به شمار می‌رود. لذا پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تاثیر زمان و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم، قارچ‌کش کاربندازیم و کلرید جیوه در مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون (*Fritillaria* spp.) در محیط کشت بافت به‌صورت طرح کاملا تصادفی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل قارچ‌کش ۰/۱ درصد در زمان‌های مختلف (صفر، ۲۵،۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه)، ۵ سطح هیپوکلریت سدیم (صفر ، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد) در زمان‌های مختلف (صفر ، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه)، الکل ۷۰ درصد با زمان (صفر ، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و کلرید جیوه (صفر ، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد با وجود این‌که کمترین درصد آلودگی در زمان ۴۰ دقیقه قارچ‌کش کاربندازیم، الکل ۷۰ درصد در زمان ۹۰ ثانیه، غلظت ۳ درصد و زمان ۱۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم و غلظت ۰/۲ درصد کلرید جیوه حاصل شد، اما میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به کمترین میزان کاهش یافت و باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها شد. طبق نتایج حاصل، بهترین تیمار با رفع آلودگی ۸۰ درصد و درصد زنده‌مانی بالا، زمان ۳۰ دقیقه قارچ‌کش، زمان ۶۰ ثانیه الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به‌ترتیب به مدت ۱۲ و ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه بود. لذا استفاده از تیمارهای ذکر شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای، جهت کاهش آلودگی و ریزازدیادی پیازهای گیاه لاله واژگون پیشنهاد می‌گردد.

کلید واژه‌ها: انقراض، درون شیشه‌ای، کلرید جیوه، گندزدایی، ریزازدیادی

مقدمه

لاله واژگون[1] یکی از گیاهان زینتی موجود در خانواده Liliaceae بوده و این تیره شامل گیاهانی غالباً علفی و دارای پیاز می‌باشد. لاله واژگون به‌دلیل زیبایی ناشی از واژگونی گل‌ها بازارپسندی بالایی دارد و در بازار کشورهای آمریکایی و اروپایی توجه خاصی به این گیاه نشان می‌دهند (Mohammadi Deh-cheshmeh *et al*., 2008). گیاه لاله واژگون از لحاظ زیبایی محیط و جذب اکوتوریست نیز حائز اهمیت است. براساس سیاست‌های سازمان حفاظت محیط زیست به‌عنوان ذخیره ژنتیکی و عنصر زیبایی شناختی قلمداد شده و نیاز به حفاظت دارند، زیرا به نظر می‌رسد که با توجه به پراکنش محدود و متراکم، جاده‌سازی، برداشت گل و پیاز، بقای لاله واژگون در آینده با چالش‌هایی روبه رو خواهد شد (Eslamzadeh *et al*., 2009).

این گیاه جزو گیاهان سمی مراتع نیز بوده و ترکیبات شیمیایی موجود در آن دارای اثرات دارویی مهمی می‌باشد، به‌طوری‌که وجود ترکیبات آلکالوییدی و گلیکوزیدی برای آن گزارش شده است. این ترکیبات شیمیایی برای درمان دردهای روماتیسمی، بیماری‌های سیستم لنفاوی و نیز به‌عنوان پاک‌کننده کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه زینتی قابلیت تولید گلدانی را نیز دارا بوده و صادرات آن به صورت گلدانی امکان‌پذیر می‌باشد (Afifian, 2010). در حال حاضر برای فایق آمدن بر مشکلات روش‌های معمول تکثیر این گیاه زینتی و تولید گیاهان عاری از آلودگی، استفاده از روش‌های کشت درون شیشه‌ای در این گیاه اهمیت زیادی پیدا کرده است. فلس سوخ از مرسوم‌ترین ریزنمونه‌های کشت بافت لاله واژگون است اما اغلب با آلودگی داخلی و خارجی قارچی و باکتریایی بسیار بالا مواجه است. مدیریت صحیح منابع ژنتیکی در این گونه، ضمن حفاظت از ذخایر ژنتیکی، منجر به استفاده از آن در برنامه‌های اصلاح و ارائه محصولی جدید در سطح جهانی خواهد شد که این امر یکی از رموز موفقیت در گلکاری نوین در جهان می‌باشد. تکثیر درون شیشه‌ای این گونه گیاهان که از راه‌های سنتی نیز با محدودیت در ازدیاد مواجه هستند، مزایای قابل توجهی دارد. این گونه‌ها به علت برداشت گل و پیاز توسط گردشگران و چرای دام‌ها در رویشگاه‌های طبیعی و به‌خصوص انواع آلودگی‌های درون‌زاد، از لحاظ اقلیم نیز دچار تهدید شده‌اند (Sadr *et al*., 2019).

در کشت درون شیشه‌ای گیاهان پیازی، وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مشکلات اساسی می‌باشند که می تواند کارایی این نوع روش‌های تکثیری را تحت تأثیر قرار دهند. آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مهم‌ترین عوامل مشکل‌ساز در روش‌های مختلف کشت درون شیشه‌ای می‌باشند (Telem *et al*., 2016). از جمله این عوامل می‌توان به قارچ‌های جنس باکتری‌های *Penicillium*، *Aspergillus*، *Alternaria*، *Pectobacterium* *Erwinia*و *Ralstonia* اشاره نمود. برای جلوگیری از این نوع آلودگی‌ها برخی ترکیبات در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرارگرفته‌اند که به نظر می‌رسد کاربرد این ترکیبات برای کم کردن یا از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی و ضد قارچی در محیط کشت درون شیشه‌ای می‌تواند میزان آلودگی را تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش دهد

[1] *Fritillaria* spp.

(Mihaljević *et al*., 2013). در آزمایشی بررسی شده است که در ریزنمونه فلس، حتی در بهترین حالت، آلودگی به‌طور کامل ریشه‌کن نمی‌شود. آلودگی داخلی بسیار بالا در لاله واژگون از موانع عدم موفقیت نسبی یا کامل در کشت بافت این جنس است و محققین معتقدند باید ریزنمونه‌های جایگزین مانند اندام‌های هوایی مورد استفاده قرارگیرد (Gholami, 2007; Hamidoghli *et al*., 2015; Mohammadi Deh cheshmeh *et al*., 2007). استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده سطحی یکی از روش‌های ممکن برای کاهش این آلودگی‌ها است. برای گندزدایی سطحی عموما از الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم و کلریدجیوه استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای کنترل آلودگی‌های داخلی و خارجی موثر هستند. آلودگی‌های داخلی معمولا چندین هفته بعد از کشت ظاهر می‌شوند. این آلودگی‌ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، اما بر روی رشد، تقسیم و سبز شدن ریز نمونه‌ها تاثیر می‌گذارند (Reed *et al*., 1995). کلریدجیوه به‌عنوان یک ضدعفونی‌کننده سطحی عمدتا همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود و کنترل طیف باکتری‌ها و قارچ‌ها و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد. نتایج بررسی نشان داد که کلریدجیوه به‌طور نسبی آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌ها را کنترل می‌کند اما درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها را در غلظت بالا کاهش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد برخی گیاهان نسبت به کلرید جیوه حساس باشند و تعیین مقدار مناسب این ماده نقش بسیار مهمی در تهیه ریزنمونه سالم و زنده دارد. تعیین مدت زمان تیمار ضدعفونی کننده در تحقیقات مختلف هم مورد توجه قرار گرفت، به‌طوری‌که گاهی از قارچ‌کش کاربندازیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به مدت۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه برای استریل کردن نمونه‌های آلوئه‌ورا استفاده شده است (Hamidoghli *et al*., 2015).

کاربندازیم قارچ‌کشی سیستمیک و عمومی است، که در کنترل بسیاری از آلودگی‌های قارچی کاربرد دارد و از آن به‌عنوان یک قارچ‌کش عمومی استفاده می‌شود. نتایج برخی گزارش‌ها نشان می‌دهد که تیمار گیاهچه‌ها قبل از ضدعفونی با این قارچ‌کش می‌تواند کارایی ضدعفونی را افزایش دهد (Zhang *et al*., 2007). با توجه به اهمیت تکنیک‌های کشت بافت گیاهی و لزوم ایجاد پروتکل‌های جدید برای کاهش آلودگی و افزایش تعداد کشت‌های سالم، هدف اصلی این مطالعه، ایجاد یک پروتکل کارآمد برای ضدعفونی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون به‌منظور افزایش کارایی کشت‌های درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه باغبانی – دانشکده کشاورزی– دانشگاه زنجان در تابستان ۱۴۰۱ انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل قارچ‌کش ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در زمان‌های مختلف (۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه)، ۵ سطح هیپوکلرید سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳) در زمان‌های مختلف (شاهد (فقط آب مقطر)، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه)، الکل ۷۰٪ با زمان (۰، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و کلرید

جیوه (شاهد (فقط آب مقطر)، ، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) جهت بررسی زنده‌مانی و مهار آلودگی در ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون، اجرا گردید.

مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه

پیازهای گیاه لاله واژگون در تیرماه ۱۴۰۱ از منطقه حفاظت شده شهرستان ماهنشان استان زنجان جمع‌آوری و به آزمایشگاه گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انتقال یافت. حوزه مورد مطالعه منطقه ماهنشان با وسعتی بالغ بر پنج هزار هکتار در دو منطقه کوهستانی واقع شده، شهرستان ماهنشان از شمال به شهرستان زنجان، از شمال باختری به شهرستان چاراویماق (استان آذربایجان شرقی)، از باختر به شهرستان تکاب (استان آذربایجان غربی)، از خاور به شهرستان زنجان، از جنوب خاوری به شهرستان ایجرود و از جنوب به شهرستان بیجار (استان کردستان) محدود می‌شود. این شهرستان در ۴۷ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۴۷ درجه و ۵۹ دقیقه درازای خاوری و ۳۶ درجه و ۲۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۵۹ دقیقه پهنای شمالی واقع شده است. مرکز این شهرستان نیز در ۴۷ درجه و ۴۰ دقیقه درازای خاوری و۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه پهنای شمالی و ارتفاع ۱۳۰۰ متری از سطح دریا واقع شده است. بر اساس مطالعات انجام شده ۲۹ گونه بوته و درختچه، ۹۶ نوع علفی‌های پهن برگ و ۴۶ گونه گرامینه و شبه‌گرامینه در محدوده مورد مطالعه وجود دارد (Zamanzadeh Darban and Joulii Tehrani, 2020).

ضدعفونی سطحی و کنترل آلودگی

پیازهای جمع‌آوری شده از طبیعت به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی گروه باغبانی دانشگاه زنجان انتقال و به‌مدت دو هفته برای گذرانده دوره سرمای مورد نیاز در یخچال در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بعد از این مدت پیازها با مایع ظرفشویی شستشو شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس به ترتیب با استفاده از پنج آزمایش زیر کنترل آلودگی سطحی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون انجام شد.

آزمایش اول: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون با استفاده از قارچ‌کش کاربندازیم (۰/۱ گرم در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر) در زمان‌های مختلف (شاهد (فقط آب مقطر)، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه) ضدعفونی گردید.

آزمایش دوم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون با استفاده از الکل ۷۰ درصد (اتانول ۹۶٪) در سه بازه زمانی (شاهد (فقط آب مقطر)، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) گندزدایی شد.

آزمایش سوم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد) ضدعفونی شد.

آزمایش چهارم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در بازه زمانی مختلف هیپوکلریت سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه) گندزدایی گردید.

آزمایش پنجم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه (شاهد (فقط آب مقطر)، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) به مدت ۷ دقیقه برای ضدعفونی قرار گرفت.

آب مقطر برای هر آزمایش به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. همچنین لازم به ذکر است که در آخر هر آزمایش ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون جهت رفع سموم موجود در ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شد. همچنین بعد از تمام شدن زمان تیمارهای ضدعفونی، ریزنمونه‌های مورد نظر در محیط کشت پایه MS بدون هورمون کشت شدند (Teixeira and Dobranszki, 2014). در نهایت، درصد زنده‌مانی و درصد مهار آلودگی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Manole *et al*., 2012).

درصد مهار آلودگی= تعدادریزنمونه‌های آلوده/تعداد کل ریزنمونه‌ها ضربدر ۱۰۰

درصد زنده‌مانی = تعدادریزنمونه‌های زنده/تعداد کل ریزنمونه‌ها ضربدر ۱۰۰

آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS V9 و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تاثیر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون افزایش یافت، به‌طوری‌که با افزایش زمان از ۲۵ به ۴۰ دقیقه مهار آلودگی به‌طور معنی‌داری بهبود یافت (شکل ۱ الف). ولی با این حال بر زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون تاثیر منفی داشت و درصد زنده‌مانی را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد (شکل ۱ ب). لذا طبق نتایج، بهترین زمان نگهداری برای گندزدایی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون ۳۰ دقیقه است، زیرا ریزنمونه‌ها کمترین آسیب را دیده و قدرت باززایی و رشد را حفظ می‌کند (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

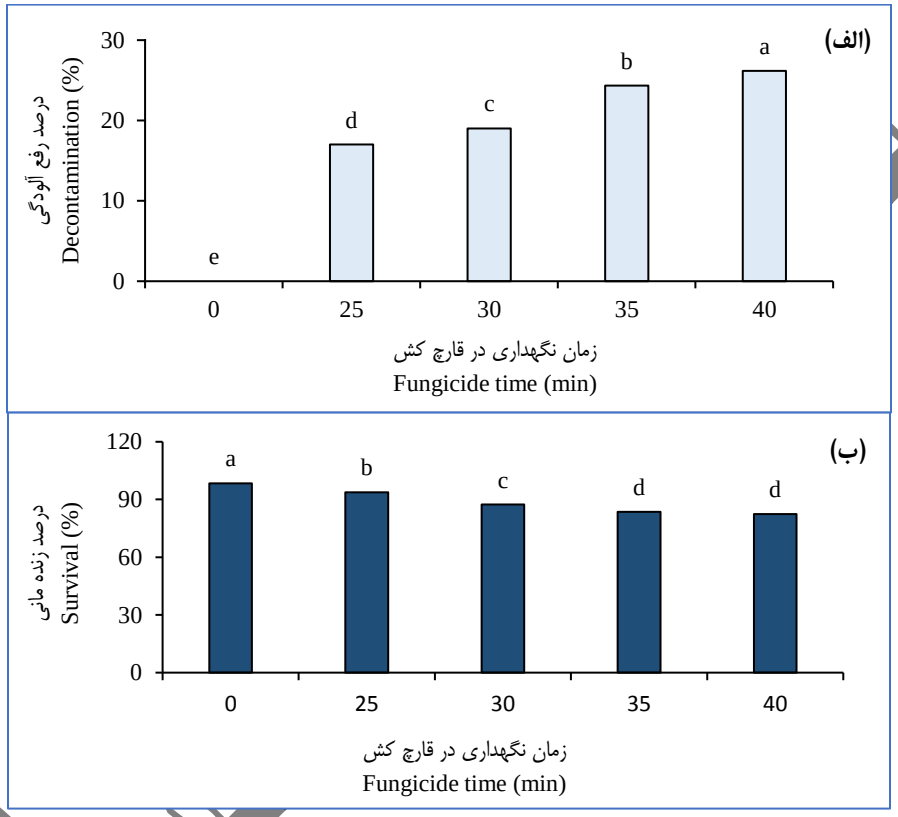
Table 1. Variance analysis of the effect of storage time in carbendazim fungicide for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

		میانگین مربعات Mean of Squares	
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	درصد رفع آلودگی Decontamination (%)	درصد زنده‌مانی Survival (%)
تکرار Replication	2	1.9500	13.0086
زمان	4	322.7666**	141.6773**

Time	8	0.6166	2.2428
خطا Error			
ضریب تغییرات C.V (%)	-	4.53	1.68

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively



شکل ۱. تاثیر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی گیاه لاله واژگون

Figure 1. The effect of storage time in carbendazim fungicide for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کاربرد قارچ‌کش‌ها می‌توانند به کنترل آلودگی در شرایط کشت بافت کمک نماید (Eed *et al*., 2010). بر اساس تحقیقات انجام شده، مؤثرترین تیمار در مقابل آلودگی قارچی، قارچ‌کش کاربندازیم می‌باشد (Ahmadi *et al*., 2012). از آنجایی‌که کاربندازیم، قارچ‌کشی سیستمیک و عمومی است، در طیف وسیعی برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های گیاهی در محصولات زراعی، باغی و زینتی استفاده می‌شود. کاربندازیم به‌صورت پودر خاکستری رنگ است و قابلیت حلالیت بالایی در آب دارد. این قارچ‌کش به‌سرعت از طریق برگ و ریشه توسط گیاه جذب می‌شود، لذا جهت حذف قارچ‌های داخلی مفید می‌باشد. محققین گزارش کردند که استفاده از تیمارهای قارچ‌کش (نظیر کاربندازیم با غلظت ۰/۵ درصد) قبل از کشت نمونه‌ها، می‌تواند به کاهش آلودگی قارچی کمک نماید (Smith,

2013; Mng'omba *et al*., 2012). آلتان و همکاران (Altan *et al*., 2010)، از تیمارهای شیمیایی مختلفی برای کنترل آلودگی میکروبی در کشت درون شیشه‌ای لیلیوم استفاده کردند و بهترین پاسخ را پس از اعمال ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاربندازیم به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیستاتین به‌مدت ۳۰ دقیقه مشاهده نمودند. نتایج مشابهی نیز در بذر کاج (Allen *et al*., 2004; Barnett and McGilvray, 2002) گزارش شده است. کاربرد محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر کاربندازیم باعث حذف کامل آلودگی از ریزنمونه‌های گیاه انجدان رومی گردید. در این تحقیق افزایش غلظت کاربندازیم در محیط کشت تاثیر منفی بر باززایی ریزنمونه‌ها داشت، روش‌های مختلف ضدعفونی و استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل آلودگی در محیط درون شیشه‌ای مورد استفاده و توصیه شده است، ولی برخی از این‌ها بهره‌وری پایین و برخی هم اثرات سمی زیادی روی ریزنمونه‌ها دارند (Khatibzadeh *et al*., 2013).

تاثیر زمان نگهداری در الکل بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر زمان نگهداری در الکل ۷۰ درصد برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون با افزایش زمان نگهداری در الکل ۷۰ درصد افزایش یافت، به‌طوری‌که با افزایش زمان از ۶۰ به ۹۰ ثانیه سبب افزایش معنی‌دار مهار آلودگی گردید (شکل ۲ الف). ولی نگهداری به مدت ۹۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد. در این صورت، بیشتر ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شده و رشد و باززایی ریزنمونه‌های گیاهی کاهش یا کاملا از بین رفت (شکل ۲ ب). بر همین اساس، بهترین زمان نگهداری در الکل برای گندزدایی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون ۶۰ ثانیه بود که سبب مهار آلودگی بیشتر و آسیب کمتر ریزنمونه‌ها گردیده و قدرت رشد و باززایی را حفظ کرد (شکل ۲).

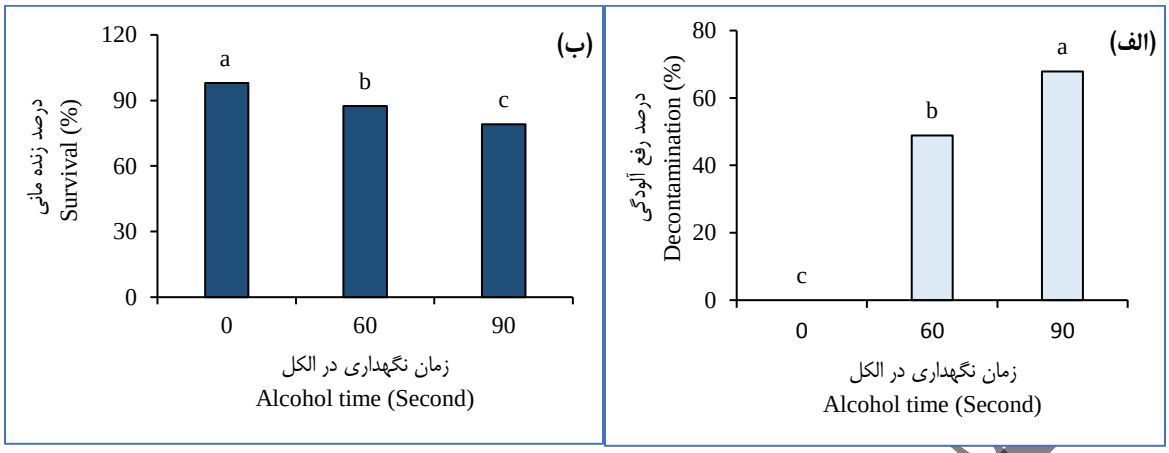
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

Table 2. Variance analysis of the effect of storage time in Alcohol for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

		میانگین مربعات Mean of Squares	
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	درصد رفع آلودگی Decontamination (%)	درصد زنده‌مانی Survival (%)
تکرار Replication	2	2.9011	12.3477
زمان Time	2	3644.6944**	271.8877**
خطا Error	4	0.8011	0.3361
ضریب تغییرات C.V (%)	-	2.30	0.65

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively



شکل ۲. تاثیر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی و زنده‌مانی گیاه لاله واژگون

Figure 2. The effect of storage time in alcohol for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

گزارش شده است که استفاده از الکل ۷۰ درصد برای گندزدایی ریزنمونه‌ها، سبب حذف لایه روی سطح کوتیکول شده و در نتیجه محلول ضدعفونی کننده اصلی می تواند قدرت نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت نمونه‌ها داشته باشد (Harum, 2013). از آن جایی‌که اولین مرحله کشت سلول و بافت گیاهی شامل انتقال ماده گیاهی از محیط خارج آزمایشگاه به شرایط آزمایشگاهی است، ضدعفونی و استقرار کشت‌ها یک مرحله مهم از پروتکل‌های ریزازدیادی و کشت بافت محسوب می‌شود (Silva and Dobranszki, 2014). آلودگی همیشه در مراحل استقرار بروز نمی‌کند بلکه برخی از آلاینده‌های داخلی هستند که بعد از مرحله کشت ظاهر شده و از بین بردن این نوع آلاینده با روش‌های معمول مشکل است. اگرچه روش‌های ضدعفونی مختلفی که توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرد، به گونه و نوع ریزنمونه بستگی دارد؛ با این حال، با اتانول ۷۰ درصد به تنهایی یا همراه با هیپوکلریت سدیم از جمله موادی هستند که به‌صورت بسیار متداول مورد استفاده قرار می‌گیرد (Karaoğlu *et al*., 2006). پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند، الکل ماده‌ای دهیدراته کننده می‌باشد که باعث تخریب غشای سلولی، واسرشت شدن سریع پروتئین‌ها و در ادامه برهم‌خوردن سوخت وساز سلول می‌شود (Cowan, 1999). از الکل ۷۰ درصد برای ضدعفونی بذرهای زوفا و ریحان نیز استفاده شده است که در این مرحله هر چه ساقه‌های انتخابی جوان‌تر باشند میزان آلودگی داخلی کاهش یافته و فرایند استریل کردن با موفقیت بیشتری همراه خواهد بود (Ahmadi *et al*., 2012).

تاثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). استفاده از غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم آلودگی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را مهار کرد و کاربرد هیپوکلرید سدیم ۳ درصد بیشترین تاثیر را در رفع آلودگی پیاز لاله واژگون داشت (شکل ۳ الف). اما افزایش غلظت این مهار کننده آلودگی، اثر منفی بر زنده‌مانی و رشد پیازها داشت. به‌طوری‌که بیشترین درصد رفع آلودگی و کمترین درصد زنده‌مانی با استفاده از هیپوکلرید سدیم ۳ درصد مشاهده شد

(شکل ۳ ب). بر همین اساس، کاربرد هیپوکلرید سدیم ۲ و ۲/۵ درصد مناسب‌ترین تیمار برای مهار آلودگی و در عین حال حفظ زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز بود (شکل ۳).

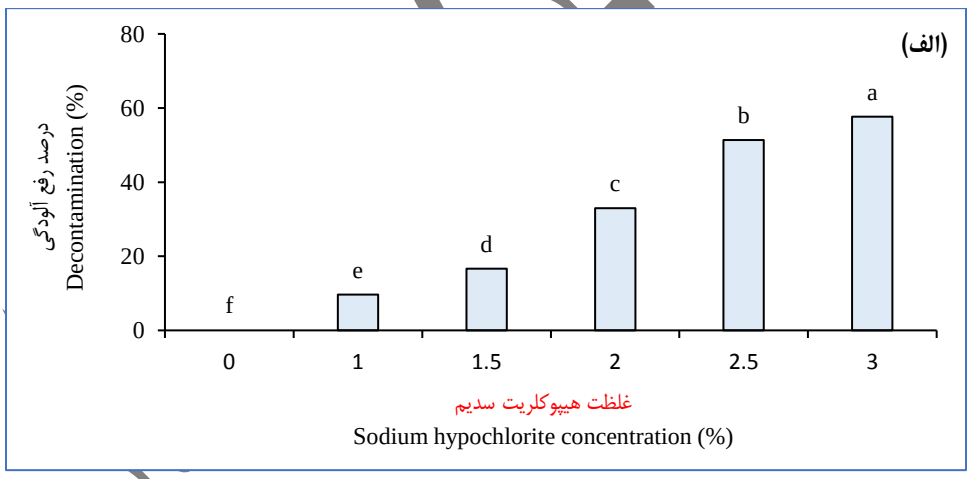
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

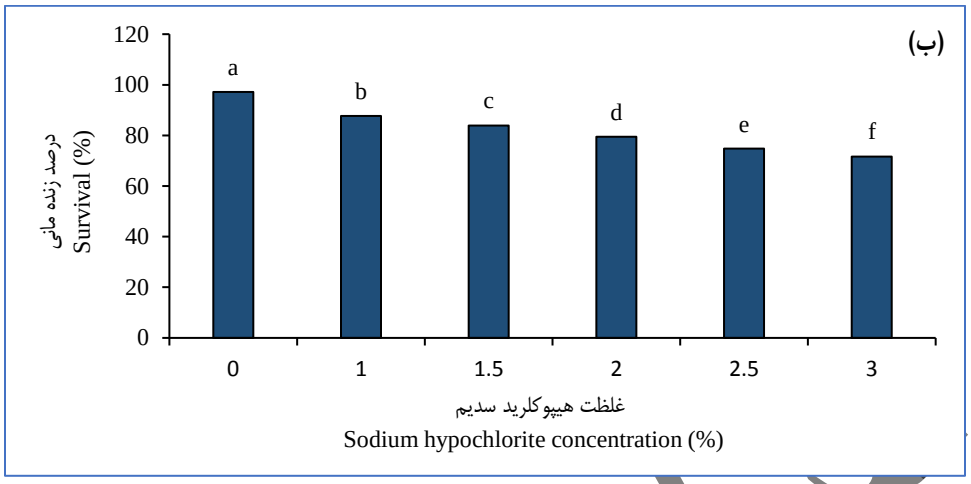
Table 3. Variance analysis of the effect of different concentrations of sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean of Squares	
		درصد رفع آلودگی Decontamination (%)	درصد زنده‌مانی Survival (%)
تکرار Replication	2	11.4444	0.1072
هیپوکلریت سدیم Sodium hypochlorite	5	8094.2777**	1281.3577**
خطا Error	10	0.7222	0.9125
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.02	1.15

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively





شکل ۳. تاثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی گیاه لاله واژگون

Figure 3. The effect of different concentrations of sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

هنگامی که هدف کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی می‌تواند لطمه‌های جبران ناپذیری به آن وارد آورد (Hosseini and Alizadeh, 2013). برای گندزدایی سطحی عموما از هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای کنترل آلودگی‌های داخلی و خارجی موثر هستند. آلودگی‌های داخلی معمولا چندین هفته بعد از کشت ظاهر می‌شوند. این آلودگی‌ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، اما بر رشد، تقسیم و سبز شدن ریز نمونه‌ها تاثیر می‌گذارند (Reed *et al*., 1995). هیپوکلریت سدیم بر ضدعفونی برخی از ارقام آلسترومریا موثر بوده است، با این وجود در بعضی از ارقام نیز تاثیر چندانی بر میزان آلودگی نداشته است (Abdi *et al*., 2008). طیف وسیعی از مواد ضدعفونی کننده مانند پروکسید هیدروژن، اتانول، نیترات نقره، آب برم، کلرید جیوه و آنتی‌بیوتیک‌ها برای ضدعفونی سطحی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ولی با این حال هیپوکلریت سدیم که به‌عنوان سفیدکننده تجاری شناخته شده است، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Smith, 2013). هیپوکلریت سدیم در برابر همه انواع باکتری‌ها قارچ‌ها و ویروس‌ها موثر است و با استفاده از اکسید کردن مولکول‌های زیستی مانند پروتئین، میکروب‌ها را می‌کشد (Yildiz and Er, 2002). یکی از موانع تکثیر گیاه زینتی نرگس طی شرایط کشت درون شیشه‌ای مهار آلودگی آن می‌باشد. طبق یافته‌های پیشین، کاربرد هیپوکلریت سدیم به‌منظور بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای منجر به کاهش یا حذف آلودگی در ریزنمونه‌های گیاه نرگس گردید (Yildiz and Er, 2002).

تاثیر زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۴). افزایش مدت زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم

از ۷ به ۱۵ دقیقه منجر به افزایش ۸۷/۵۴ درصدی در مهار آلودگی پیاز لاله واژگون گردید (شکل ۴ الف). با افزایش زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم درصد زنده‌مانی پیازها کاهش یافت و کمترین میزان باززایی ریزنمونه‌های پیازدر زمان نگهداری به مدت ۱۵ دقیقه مشاهده شد، به‌طوری‌که باعث قهوه ای شدن ریزنمونه‌های پیاز گردید (شکل ۴ ب). با توجه به درصد مهار آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، زمان ۱۰ و ۱۲ دقیقه موثرترین تیمار برای کاهش آلودگی و بهبود رشد و باززایی نمونه‌ها بود (شکل ۴).

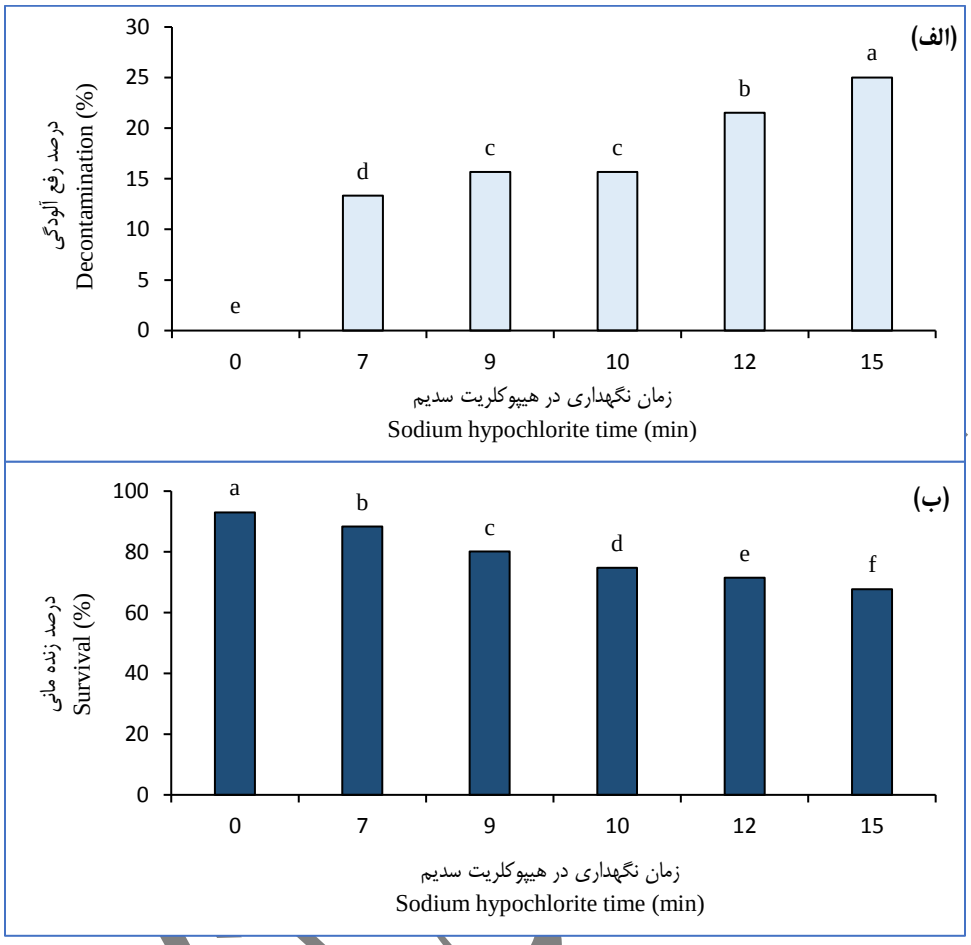
جدول ٤- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های لاله واژگون

Table 4. Variance analysis of effects of storage time in sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

		میانگین مربعات Mean of Squares	
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	درصد رفع آلودگی Decontamination (%)	درصد زنده‌مانی Survival (%)
تکرار Replication	2	0.3405	23.6538
زمان Time	5	222.9088**	291.7435**
خطا Error	10	0.3398	1.4445
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.82	1.51

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively



شکل ٤. تاثیر زمان‌های مختلف تیمار هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی گیاه لاله واژگون

Figure 4. The effect of different times of sodium hypochlorite treatment for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

اندام‌هایی نظیر ریزوم، استولون و سوخ که زیر خاک تشکیل می‌گردند، علائم شدید آلودگی را طی مراحل کشت بافت از خود نشان می‌دهند، که با اعمال تیمارهایی نظیر غلظت‌های بالا مواد ضدعفونی کننده و افزایش مدت زمان اعمال تیمار ضدعفونی، می‌توان علائم آلودگی را تا حدودی کاهش داد. با این حال با اعمال چنین تیمارهایی، گاهی اوقات آلودگی در سطح بالا مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد که قارچ‌های عامل آلودگی بدون بروز هیچگونه علائم ظاهری، در داخل بافت‌های گیاهی قرار دارند که پس از کشت، این علائم ظاهر می‌شوند. بنابراین ضروری به‌نظر می‌رسد که روش‌های دیگر نظر اعمال تیمار حرارتی و زمان‌ها و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم جهت کنترل آلودگی داخلی بافت‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد (Kharrazi *et al*., 2016). روش مورد استفاده در گندزدایی می‌تواند تابع عوامل مختلف گیاهی یا محیطی مانند گونه گیاهی، سن، نوع ریزنمونه، میزان سمیت عامل گندزدا، نوع آلودگی، هزینه اقتصادی و شرایط محیطی حاکم بر آن باشد (Mng'omba *et al*., 2012). ترکیبات گندزدا برای بافت‌های گیاهی

سمی می‌باشند و کاربرد غلظت مناسب، مدت زمان قرارگیری ریزنمونه در معرض عوامل گندزدا و ترتیب استفاده از این مواد باید برای به حداقل رسانیدن آسیب به بافت و حداکثر زنده‌مانی ریزنمونه‌ها بهینه‌سازی شود (Mahmoud and Al-Ani, 2016). برای ضدعفونی ریزنمونه -ها، استفاده از الکل به اضافه هیپوکلریت سدیم عنوان بهترین تیمار ضدعفونی معرفی شده طی انجام ضدعفونی، مواد زنده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست دهند و تنها باید آلودگی حذف گردد بنابراین باید غلظت مواد مورد استفاده و مدت زمان اعمال تیمارهای مورد نظر به طور متعادل با توجه به نوع ریزنمونه تعیین گردد (Khatibzadeh *et al*., 2013).

در آزمایشی تحت عنوان تیمارهای بذر برای مدیریت بیماری باکتریایی لکه‌برگی، کاربرد هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲ و ۵ درصد به مدت ۱۵ و ۵ دقیقه در کاهو نشان داد که تیمار بذور کاهو روی کنترل آلودگی باکتریایی نسبتاً بی اثر بوده و تیمار بذور با هیپوکلریت سدیم با غلظت ۱ درصد برای ۱۵ دقیقه توانست آلودگی باکتریایی را به میزان ۲ درصد کاهش دهد (Pernezny *et al*., 2002).

تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری نشان داد (جدول ۵). استفاده از غلظت‌های مختلف کلرید جیوه درصد مهار آلودگی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد، ولی بین غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلرید جیوه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵ الف). افزایش غلظت این مهار کننده آلودگی اثر منفی بر زنده‌مانی و رشد پیازها داشت، به‌طوری‌که افزایش غلظت کلرید جیوه از ۰/۱ به ۰/۲ درصد سبب کاهش ۳۰/۲۵ درصدی زنده‌مانی ریزنمونه‌ها گردید و بالاترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در این تیمار مشاهده شد (شکل ۵ ب). از آنجایی‌که اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلرید جیوه در مهار آلودگی وجود نداشت، لذا موثرترین تیمار بود (شکل ۵).

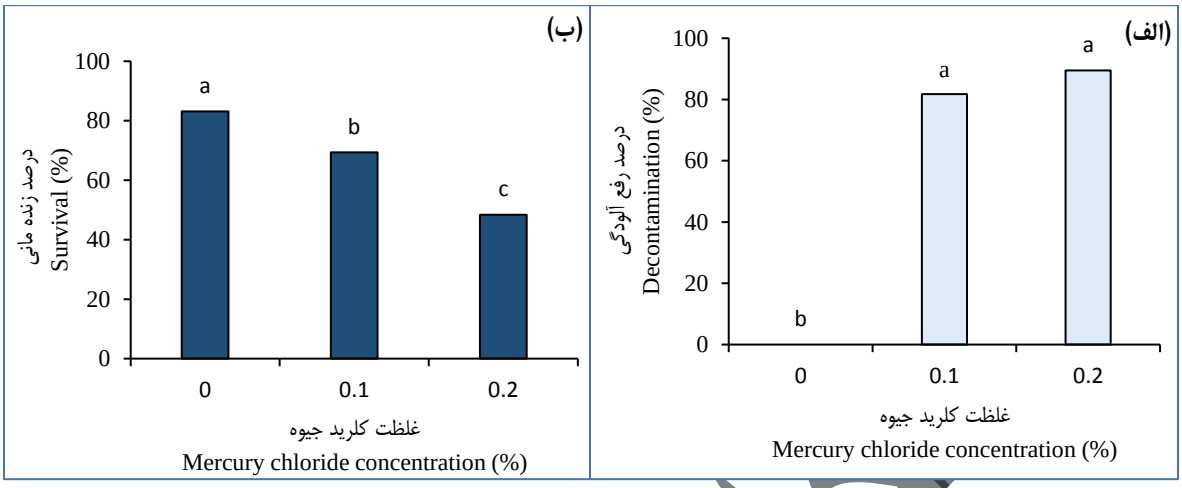
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

Table ۵. Variance analysis of effects of different concentrations of Mercury chloride for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

		میانگین مربعات Mean of Squares	
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	درصد رفع آلودگی Decontamination (%)	درصد زنده‌مانی Survival (%)
تکرار Replication	2	1.1077	10.0133
کلرید جیوه Mercury chloride	2	7373.9144**	918.4933**
خطا Error	4	1.0327	1.3266
ضریب تغییرات C.V (%)	-	1.78	1.71

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively



شکل ۵. تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

Figure 5. The effect of different concentrations of mercuric chloride on decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

کلرید جیوه به‌عنوان یک ضدعفونی کننده سطحی عمدتا همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود و کنترل طیف وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها را بر عهده دارد و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد. نتایج مطالعات پژوهشی نشان داده است (Alam *et al*., 2010) که کلرید جیوه به‌طور نسبی آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌ها را کنترل می کند اما درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های گل نیلوفر را کاهش داد، به‌طوری که در یکی از ارقام باعث مرگ کامل ریزنمونه ها شد. به‌نظر می‌رسد برخی گیاهان نسبت به کلرید جیوه حساس باشند و تعیین مقدار مناسب این ماده نقش بسیار مهمی در تهیه ریزنمونه سالم و زنده دارد (Alam *et al*., 2010). لازم به توضیح است که با افزایش میزان کلرید جیوه به‌کار رفته برای ضدعفونی از ۰/۰۳ درصد بـه ۰/۱ درصد، رشد گیاهچه‌ها کاهش یافت؛ به‌طوری‌که در تیمار ۰/۱ درصد، ریزنمونه‌ها فقط سبز شدند و بندرت شاخه تولید کردند. همچنین ریز نمونه‌هایی که در غلظت ۰/۰۳ درصد کلرید جیوه ضدعفونی شده بودند شاخه‌هایی تولید کردند که از لحاظ ظاهری ضعیف‌تر بوده و به سختی ریشه تولید می‌کردند. در گل پریوش علی‌رغم کنترل کامل آلودگی ریزنمونه‌ها، تمام غلظت‌های اعمال شده باعث عدم رشد ریزنمونه‌ها شد. آزمون تترازولیوم، مرگ ریزنمونه‌ها را تایید نمود (Sain and Sharma, 2013). گزارش‌هایی در مورد تاثیر کلریدجیوه بر مرگ ریزنمونه‌ها وجود دارد. در پژوهشی استفاده از غلظت ۰/۱ درصد کلرید جیوه در زمان‌های متفاوت برای سنجش میزان آلودگی، زنده‌مانی و مرگ و میر جوانه‌های انگور استفاده شد (Kashif, 2005). پژوهشی در گیاه آلوئه‌ورا نشان داد که بهترین روش ضدعفونی، کاربرد اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه، محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱ دقیقه، با هیپوکلرید سدیم ۳ درصد و زمان ۹ دقیقه بود (Shamsian *et al*., 2016). همچنین کلرید جیوه ۰/۱درصد مؤثرترین تیمار ضدعفونی در کنترل آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های آلوئه‌ورا است (Saggoo and Kaur, 2010) که با نتایج این پژوهش همسویی دارند. در آزمایشی از کلریدجیوه ۰/۱ درصد برای کاهش آلودگی ریزنمونه حاصل از

گره گیاه همیشه سبز چند ساله *Operculina turpethum* استفاده نموده و نتایج مثبتی از نظر کنترل آلودگی گزارش کردند. به‌نظر می‌رسد که در گیاه آلسترومریا غلظت بالاتر از ۰/۱ درصد باعث مرگ ریز نمونه‌ها می‌شود و استفاده از غلظت‌های کمتر و زمان‌های کوتاه‌تر می‌تواند راه‌حلی برای کاهش آلودگی در این گیاه می‌باشد (Alam *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری

کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی، به‌خصوص در رابطه با گیاهان سوخ‌دار و پیازی که در تماس مستقیم با بستر کشت می‌باشند، یکی از مراحل اساسی در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. اعمال تیمارهای مختلف از جمله کاربرد تیمارهای قارچ‌کش، الکل، هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه در محیط کشت می‌تواند به کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی در گیاه لاله واژگون کمک نماید. با این حال اعمال چنین تیمارهای می‌تواند تأثیر منفی بر پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها داشته باشد، لذا انتخاب تیمار مناسب به‌نحوی که باعث کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی و از سوی دیگر حفظ پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها گردد، حائز اهمیت می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، با وجود آن‌که کمترین درصد آلودگی در شرایط اعمال قارچ‌کش ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۲ درصد به‌دست آمد؛ اما درصد زنده‌مانی و قابلیت باززایی نمونه‌ها را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داده و باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردید. بر همین اساس، کاربرد قارچ‌کش ۰/۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به‌ترتیب به مدت ۱۲ و ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد با کاهش درصد آلودگی و حفظ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، توان رشد و باززایی ریزنمونه‌های پیاز لاله‌واژگون را بهبود بخشید. لذا در شرایط کشت درون شیشه‌ای، استفاده از تیمارهای ذکر شده جهت مهار آلودگی و تکثیر بهینه پیازهای گیاه لاله واژگون توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

تشکر و قدردانی از مسئولین محترم منابع طبیعی و اداره محیط زیست شهرستان ماهنشان که در انجام این پژوهش دانشجویی مساعدت کافی را داشته‌اند.

منابع

1. Abdi, G., Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum 30*: 709-714. https://doi.org/10.1007/s11738-008-0169-z
2. Afifian, M. (2010). Identification and determination of some active ingredients of *Fritillaria imperialis* and relation of it to the habitat conditions, Western area of Isfahan province. M.Sc thesis Natural resources faculty, Isfahan University of Technology.
3. Ahmadi, E., Nasr, S. M. H., Jalilvand, H., & Savadkoohi, S. K. (2012). Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christti] seed *in vitro* culture. *Trees 26*. 1299-1304. https://doi.org/10.1007/s00468-012-0705-8
4. Alam, J., Alam, I., Sharmin, S.A., Rahman, M., Anisuzzaman, M., & Alam, M.F. (2010). Micropropagation and antimicrobial activity *of Operculina* turpethum' (Syn.'Ipomoea turpethum'), an endangered medicinal Plant. *Plant Omics 3*(2): 40-46.
5. Allen, T.W., Enebak, S.A., & Carey, W.A. (2004). Evaluation of fungicides for control of species of Fusarium on longleaf pine seed. *Crop Protection 23*(10): 979-982. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.02.010
6. Altan, F., Bürün, B., & Sahin, N. (2010). Fungal contaminants observed during micropropagation of Lilium candidum L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. *African Journal of Biotechnology 9*(7): 991-995. 10.5897/AJB08.090
7. Barnett, J.P., & McGilvray, J.M. (2002). Reducing Seed and Seedlings Pathogens Improves Longleaf Pine Seedlings Production. *In: Gen. Tech. Rep. SRS-56. Asheville, NC: US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. p. 19-20.*
8. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews 12*(4): 564-582. https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564
9. Eed, A.M., Reddy, S.A., Reddy, K.M., Silva, J.A.T., Reddy, P.V., Beghum, H., & Venkatsubbaiah, P.Y. (2010). Effect of antibiotics and fungicides on the in vitro production of Citrus limonia Osbeck nodal segment and shoot tip explants. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 4*(1): 66-70.
10. Eslamzadeh, N., Hoseini, H., Moradi, H., & Dehkordi, F. (2009). Introduction of new habitat for the *Fritillaria*, a GIS. *Production and Processing of Agricultural and Horticultural Products Journal* 8(16).
11. Gholami, M. (2007*). Micropropagation of of inverted tulip (Fritillaria imperialis L.) (Doctoral dissertation, MSc. Thesis, University of Avicenna. Hamedan, Iran).*
12. Hamidoghli, S., Chamani, E., Hamidoghli, Y., & Talei, N. (2015). Effect of different plant growth regulators on direct bulblet regeneration from scale explants of *Fritillaria imperialis*. *Isfahan University of Technology Journal of Crop Production and Processing 5*(16): 211-218. 10.18869/acadpub.jcpp.5.16.211

13. Harum, N. (2013). Surface sterilization procedures for leaves explants of rhododendron (Rhododendron javanicum (Blume) Benn) cultured in vitro, *The third Basic Science International Conference* 21: 1-4.
14. Hosseini, B., & Alizadeh, M. (2013). Effect of biomass and BAP hormone on in vitro regeneration of medicinal herb (*Hyssopus officinalis L.*). *Journal of Horticulture*. 27: 207-201. (In persian)
15. Karaoğlu, C., Çöcü, S., Ipek, A., Parmaksız, I., Uranbey, S., Sarıhan, E. et al. (2006). In vitro micropropagation of *saffron*. In II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739 (pp. 223-227). 10.17660/ActaHortic.2007.739.28
16. Kashif, M. (2005). Effect of duration of mercuric chloride treatment on culture viability, contamination and mortality of various accessions of grapes. *Sarhad Journal of Agriculture (Pakistan) 21*(1).
17. Kharrazi, M., Tehranifar, A., Nemati, H., & Bagheri, A. (2016). *Investigation of different methods of Amaryllis (Hippeastrum× johnsonii) culturing and propagation for increasing the proliferation rate during in vitro and greenhouse conditions* (Doctoral dissertation, Ph. D. Dissertation. Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian).
18. Khatibzadeh, R., Azizi, M., Arouiee, H. and Farsi, M. (2013). Effects of Sterilization Protocol and Prechilling Treatment on In vitro Seed Germination of *Levisticum officinale Koch*, *Journal of Horticultural Science*, 27(2): 130-138. 10.22067/JHORTS4.V0I0.24810
19. Mahmoud, S.N., & Al-Ani, N.K. (2016). Effect of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of Cestrum nocturnum L. *International Journal of Research Studies in Biosciences 4*(1): 4-9. http://dx.doi.org/10.20431/2349-0365.0401002
20. Manole, C. G., Balan, V., Mencinicopschi, I. C., Golea, D., Rodino, S., & Butu, A. (2012). The influence of growth regulators concentrations on in vitro micropropagation of *Ribes rubrum species. Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies*, Vol. XVI, 2012. ISSN-L 2285-1364.
21. Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Cmelik, Z., Puskar, B., & Jurkovic, Z., 2013. In vitro sterilization procedures for micropropagation of' oblacinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences* 58: 117-126. https://doi.org/10.2298/JAS1302117M
22. Mng'omba S.A., du Toit E.S., Akinnifesi F.K., & Sileshi G. (2012). Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria.
23. Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A. & Naderi, R. (2007). Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(11): 1875-1879. https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1875.1879
24. Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M. & Ebrahimie, E. (2008). Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis L. Acta Physiologiae Plantarum* 30(3): 395-399. https://doi.org/10.1007/s11738-007-0126-2

25. Pernezny, K., Nagata, R., Raid, R.N., Collins, J., & Carroll, A. (2002). Investigation of seed treatments of management of bacterial leaf spot *of lettuce. Journal of Plant Disease* 151-155. https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.2.151
26. Reed, B.M., Buckley, P.M., & DeWilde, T. N. (1995). Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 31*: 53-57. https://doi.org/10.1007/BF02632228
27. Sadr, S.S., Zakizadeh, H, Naghavi, M.R., Olfati, J., & Hazrati, K. (2019). Introducing a tissue culture protocol for fritillaria (*Fritillaria raddeana*) via seed and bulb scales. *Iranian Journal of Horticultural Science 49*(4). 10.22059/ijhs.2017.230135.1219
28. Saggoo, M., & Kaur, R. (2010). Studies in North Indian Aloe vera: callus induction and regeneration of plantlets. *Archives of Applied Science Research 2*(2): 241-245.
29. Sain, M., & Sharma, V. (2013). International journal of pure & applied bioscience Catharanthus roseus (an anti-cancerous drug yielding plant)—a review of potential therapeutic properties. *International Journal of Pure & Applied Bioscience 1*(6), 139-142.
30. Shamsian, S., Omidi, M., & Torabi, C. (2016). effect of growth regulators and active charcoal on the proliferation of Aloe vera L. in vitro. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 32*: 281-289.35.
31. Silva, J.A., & Dobránszki, J. (2014). Sonication (Ultrasound) Affects In Vitro Growth of Hybrid Cymbidium. *Botanica Lithuanica (1392-1665) 20*(2). 10.2478/botlit-2014-0014
32. Smith R.H. (2013). Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
33. Teixeira da Silva JA, Dobranszki J. 2014. Sonication (ultrasound) affects In Vitro growth of hybrid Cymbidium. Bot Lith 20:121-130
34. Telem, R.S., Sadhukhan, R., Mandal, N., Wani, S.H., Sarkar, H.K., & Naorem, B.S. (2016). Estimating the efficiency of different explants for direct in Vitro multiple shoots development in chrysanthemum. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology 9*(3): 345-352. http://dx.doi.org/10.5958/2230-732X.2016.00045.0
35. Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften 89*: 259-261. https://doi.org/10.1007/s00114-002-0310-6
36. Zamanzadeh Darban, M., & Joulii Tehrani, M. (2020) Adventurer in Zanjan book. Travel and tourism books, Shakib Publications, p. 40.
37. Zhang, L.Z., Wei, N., Wu, Q.X., & Ping, M.L. (2007). Anti-oxidant response of *Cucumis sativus* L. to fungicide carbendazim. *Pesticide biochemistry and physiology* 89(1), 54-59. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.02.007

نسخه پیش انتشار