

The Effect of Time and Different Concentrations of Sodium Hypochlorite, Carbendazim Fungicide and Mercuric Chloride in Inhibiting the Contamination of *Fritillaria* spp. Bulbs in Tissue Culture Environment

L. Moradi¹, S.N. Mortazavi ^{2*}, M. Alaei ²

1 and 2- Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: mortazavi46@gmail.com)

Received: 27-01-2024
Revised: 20-03-2024
Accepted: 05-04-2024
Available Online: 05-04-2024

How to cite this article:

Moradi, L., Mortazavi, S.N., & Alaei, M. (2024). The effect of time and different concentrations of sodium hypochlorite, carbendazim fungicide and mercuric chloride in inhibiting the contamination of *Fritillaria* spp. bulbs in tissue culture environment. *Journal of Horticultural Science*, 38(2), 465-478. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322>

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. This plant is among the poisonous plants of pastures and the chemical compounds present in it have important medicinal effects, so that the existence of alkaloid and glycosidic compounds has been reported for it. These chemical compounds are used to treat rheumatic pains, lymphatic system diseases and also as liver cleansers. This ornamental plant also has the ability to produce pots and its export is possible in pots. Currently, in order to overcome the issues of the usual methods of propagation of this ornamental plant and to produce pollution-free plants, the use of in vitro cultivation methods in this plant has become very important. bulbous is one of the most common explants of inverted tulip tissue culture, but it often faces very high internal and external fungal and bacterial contamination. In the in vitro culture of onion plants, the existence of fungal and bacterial contaminations are one of the main problems that can affect the efficiency of this type of propagation methods. Fungal and bacterial contaminations are one of the most important problematic factors in different in vitro culture methods. Internal contamination usually appears several weeks after planting. These contaminations may not be seen externally, but they affect the growth, division and greening of small samples. Mercuric chloride is mainly used as a surface disinfectant along with sodium hypochlorite and it controls the spectrum of bacteria and fungi and increases the disinfection efficiency. The results of the study showed that mercuric chloride relatively controls the bacterial and fungal contamination of the samples, but it reduces the survival percentage of the samples in high concentration. It seems that some plants are sensitive to mercuric chloride and determining the appropriate amount of this substance plays a very important role in preparing a healthy and living specimen. Determining the duration of disinfectant treatment was also considered in various researches, so that sometimes carbendazim 1% fungicide for 20 minutes, 70% alcohol for 60 seconds, sodium hypochlorite 2.5% for 10 minutes. And 0.1% mercury chloride was used for 7 minutes to sterilize aloe vera sample. Considering the importance of plant tissue culture techniques and the need to create new protocols to reduce contamination and increase the number of healthy cultures, the main goal of this study is to create an efficient protocol for the disinfection of *Fritillaria* spp. onion explants in order to increase the efficiency of in vitro cultures.



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322>

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 control of fungal and bacterial contamination, especially in relation to bulbous and bulbous plants that are in direct contact with the culture medium, is one of the basic steps in in vitro culture conditions. Applying different treatments including the use of fungicides, alcohol, sodium hypochlorite and mercuric chloride in the cultivation environment can help control fungal and bacterial contamination in the *Fritillaria* spp. plant. However, the application of such treatments can have a negative effect on the regeneration potential of the explants, so it is important to choose the appropriate treatment in a way that controls the fungal and bacterial contamination and on the other hand preserves the regeneration potential of the explants. This study investigated the effectiveness of various disinfection protocols on Laleh-Avgagun onion explants. While the lowest contamination (0%) was achieved using 0.1% fungicide for 40 minutes, 70% alcohol for 90 seconds, 3% sodium hypochlorite for 15 minutes, and 0.1% mercury chloride, this treatment significantly reduced explant survival and regeneration, causing browning. Conversely, applying 0.1% fungicide for 30 minutes, 70% alcohol for 60 seconds, 2% or 2.5% sodium hypochlorite for 12 or 10 minutes respectively, and 0.1% mercury chloride effectively reduced contamination while maintaining explant survival. This optimized protocol improved the growth and regeneration ability of the explants. Therefore, in the conditions of in vitro cultivation, the use of the mentioned treatments is recommended to control contamination and optimal reproduction of the bulbs of *Fritillaria* spp. plant.

Keywords: Disinfection, Extinction, *In vitro*, Mercuric chloride, Micropropagation

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

لطافت مرادی^۱ - سید نجم الدین مرتضوی^{۲*} - میترا اعلائی^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۷

چکیده

رفع آلودگی به عنوان یک چالش اساسی در تکنیک کشت سلول، بافت و اندام گیاهی به شمار می‌رود. با اینکه روش‌های مختلفی برای این منظور وجود دارد، اما توسعه روش‌های ضد عفونی مختص هر گونه یک عامل مهم در استقرار و موفقیت سیستم کشت بافت به شمار می‌رود. لذا، پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر زمان و غلظت‌های مختلف هیپوکلیت سدیم، قارچ‌کش کاربندازیم و کلرید جیوه در مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون (*Fritillaria spp.*) در محیط کشت بافت به صورت طرح کاملاً 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)، پنج سطح هیپوکلیت 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 که 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 هیپوکلیت 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، هیپوکلیت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به ترتیب به مدت ۱۲ و ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت هفت دقیقه بود. لذا استفاده از تیمارهای ذکر شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای، جهت کاهش آلودگی و ریزازدیادی پیازهای گیاه لاله واژگون پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: انقراض، درون شیشه‌ای، ریزازدیادی، کمیاب، گندزدایی

مقدمه

حفاظت دارند، زیرا به نظر می‌رسد که با توجه به پراکنش محدود و متراکم، جاده سازی، برداشت گل و پیاز، بقای لاله واژگون در آینده با چالش‌هایی روبه‌رو خواهد شد (Eslamzadeh et al., 2009). این گیاه جزء گیاهان سمی مراتع نیز بوده و ترکیبات شیمیایی موجود در آن دارای اثرات دارویی مهمی می‌باشد، به طوری که وجود ترکیبات آلکالوئیدی و گلیکوزیدی برای آن گزارش شده است. این ترکیبات شیمیایی برای درمان دردهای روماتیسمی، بیماری‌های سیستم لنفاوی و نیز به عنوان پاک‌کننده کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه زینتی قابلیت تولید گلدانی را نیز دارا بوده و صادرات

لاله واژگون^۲ یکی از گیاهان زینتی موجود در خانواده Liliaceae بوده و این تیره شامل گیاهانی غالباً علفی و دارای پیاز می‌باشد. لاله واژگون به دلیل 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 به عنوان ذخیره ژنتیکی و عنصر زیبایی شناختی قلمداد شده و نیاز به

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: mortazavi46@gmail.com)

آن به صورت گلدانی امکان پذیر می باشد (Affian, 2010). در حال حاضر، برای فایق آمدن بر مشکلات روش های معمول تکثیر این گیاه زینتی و تولید گیاهان عاری از آلودگی، استفاده از روش های کشت درون شیشه ای در این گیاه اهمیت زیادی پیدا کرده است. فلس سوخ از مرسوم ترین ریزنمونه های 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 برنامه های اصلاح و ارائه محصولی جدید در سطح جهانی خواهد شد که این امر یکی از رموز موفقیت در گلکاری نوین در جهان می باشد. تکثیر درون شیشه ای این گونه گیاهان که از راه های سنتی نیز با محدودیت در ازدیاد مواجه هستند، مزایای قابل توجهی دارد. این گونه ها به علت برداشت گل و پیاز توسط گردشگران و چرای دام ها در ریشگاه های طبیعی و به خصوص انواع آلودگی های درون زاد، از لحاظ اقلیم نیز دچار تهدید شده اند (Sadr et al., 2019).

در کشت درون شیشه ای گیاهان پیازی، وجود آلودگی های قارچی و باکتریایی از مشکلات اساسی می باشند که می تواند کارایی این نوع روش های تکثیری را تحت تأثیر قرار دهند. آلودگی های قارچی و باکتریایی از مهم ترین عوامل مشکل ساز در روش های مختلف کشت درون شیشه ای می باشند (Telem et al., 2016). از جمله این عوامل می توان به قارچ های جنس باکتری های *Aspergillus*، *Penicillium*، *Erwinia*، *Alternaria*، *Pectobacterium* و *Ralstonia* اشاره نمود. برای جلوگیری از این نوع آلودگی ها، برخی ترکیبات در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرار گرفته اند که به نظر می رسد کاربرد این ترکیبات برای کم کردن یا از بین بردن آلودگی های باکتریایی و ضدقارچی در محیط کشت درون شیشه ای می تواند میزان آلودگی را تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش دهد (Mihaljević et al., 2013).

مواد و روش ها

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه باغبانی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه زنجان در تابستان سال ۱۴۰۱ انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل قارچ کش ۰/۱ میلی گرم بر لیتر در زمان های مختلف (صفر، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه)، پنج سطح هیپوکلرید سدیم (شاهد فقط آب مقطر)، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ در زمان های مختلف (شاهد فقط آب مقطر)، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه، الکل ۷۰ درصد با زمان (صفر، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و کلرید جیوه (شاهد فقط آب مقطر)، ۰/۱ و ۰/۲ درصد جهت بررسی زنده ماندن و مهار آلودگی در ریزنمونه های پیاز لاله واژگون اجرا گردید.

مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه

پیازهای گیاه لاله واژگون در تیرماه سال ۱۴۰۱ از منطقه حفاظت شده شهرستان ماهنشان استان زنجان جمع آوری 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

آن به صورت گلدانی امکان پذیر می باشد (Affian, 2010). در حال حاضر، برای فایق آمدن بر مشکلات روش های معمول تکثیر این گیاه زینتی و تولید گیاهان عاری از آلودگی، استفاده از روش های کشت درون شیشه ای در این گیاه اهمیت زیادی پیدا کرده است. فلس سوخ از مرسوم ترین ریزنمونه های 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 برنامه های اصلاح و ارائه محصولی جدید در سطح جهانی خواهد شد که این امر یکی از رموز موفقیت در گلکاری نوین در جهان می باشد. تکثیر درون شیشه ای این گونه گیاهان که از راه های سنتی نیز با محدودیت در ازدیاد مواجه هستند، مزایای قابل توجهی دارد. این گونه ها به علت برداشت گل و پیاز توسط گردشگران و چرای دام ها در ریشگاه های طبیعی و به خصوص انواع آلودگی های درون زاد، از لحاظ اقلیم نیز دچار تهدید شده اند (Sadr et al., 2019).

در کشت درون شیشه ای گیاهان پیازی، وجود آلودگی های قارچی و باکتریایی از مشکلات اساسی می باشند که می تواند کارایی این نوع روش های تکثیری را تحت تأثیر قرار دهند. آلودگی های قارچی و باکتریایی از مهم ترین عوامل مشکل ساز در روش های مختلف کشت درون شیشه ای می باشند (Telem et al., 2016). از جمله این عوامل می توان به قارچ های جنس باکتری های *Aspergillus*، *Penicillium*، *Erwinia*، *Alternaria*، *Pectobacterium* و *Ralstonia* اشاره نمود. برای جلوگیری از این نوع آلودگی ها، برخی ترکیبات در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرار گرفته اند که به نظر می رسد کاربرد این ترکیبات برای کم کردن یا از بین بردن آلودگی های باکتریایی و ضدقارچی در محیط کشت درون شیشه ای می تواند میزان آلودگی را تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش دهد (Mihaljević et al., 2013).

در آزمایشی بررسی شده است که در ریزنمونه فلس، حتی در بهترین حالت، آلودگی به طور کامل ریشه کن نمی شود. آلودگی داخلی بسیار بالا در لاله واژگون از موانع عدم موفقیت نسبی یا کامل در کشت بافت این جنس است و محققین معتقدند باید ریزنمونه های جایگزین مانند اندام های هوایی مورد استفاده قرار گیرد (Gholami, Hamidoghli et al., 2007; Mohammadi Deh Cheshmeh et al., 2015). استفاده از مواد ضدعفونی کننده سطحی یکی از روش های ممکن برای کاهش این آلودگی ها است. برای گندزدایی سطحی عموماً از الکل ۷۰ درصد، هیپوکلرید سدیم، هیپوکلرید کلسیم و کلرید جیوه استفاده می شود. آنتی بیوتیک ها نیز برای کنترل آلودگی های داخلی و خارجی مؤثر هستند. آلودگی های داخلی معمولاً چندین هفته بعد از کشت ظاهر می شوند. این آلودگی ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، اما بر روی رشد، تقسیم و سبز شدن ریز نمونه ها تأثیر می گذارند (Reed et

آب مقطر برای هر آزمایش به‌عنوان 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 & Dobranszki, 2014). در نهایت، درصد زنده‌مانی و درصد مهار آلودگی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Manole et al., 2012).

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

درصد زنده‌مانی = تعداد ریزنمونه‌های 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 احتمال پنج درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تأثیر 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، به طوری که 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 تأثیر 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).

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کاربرد قارچ‌کش‌ها می‌توانند به کنترل آلودگی در شرایط کشت بافت کمک نماید (Eed et al., 2010). براساس تحقیقات انجام شده، مؤثرترین تیمار در مقابل آلودگی قارچی، قارچ‌کش کاربندازیم می‌باشد (Ahmadi et al., 2012).

کوهستانی واقع شده، شهرستان ماهنشان از شمال به شهرستان زنجان، از شمال باختری به شهرستان چارویماق (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 در ازای 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 و ۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه پهنای شمالی و ارتفاع ۱۳۰۰ متری از سطح دریا واقع شده است. براساس 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 & 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 گذراندن دوره سرمای مورد نیاز در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از این مدت، پیازها با مایع ظرفشویی شستشو شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس، به‌ترتیب 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 درصد) 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.

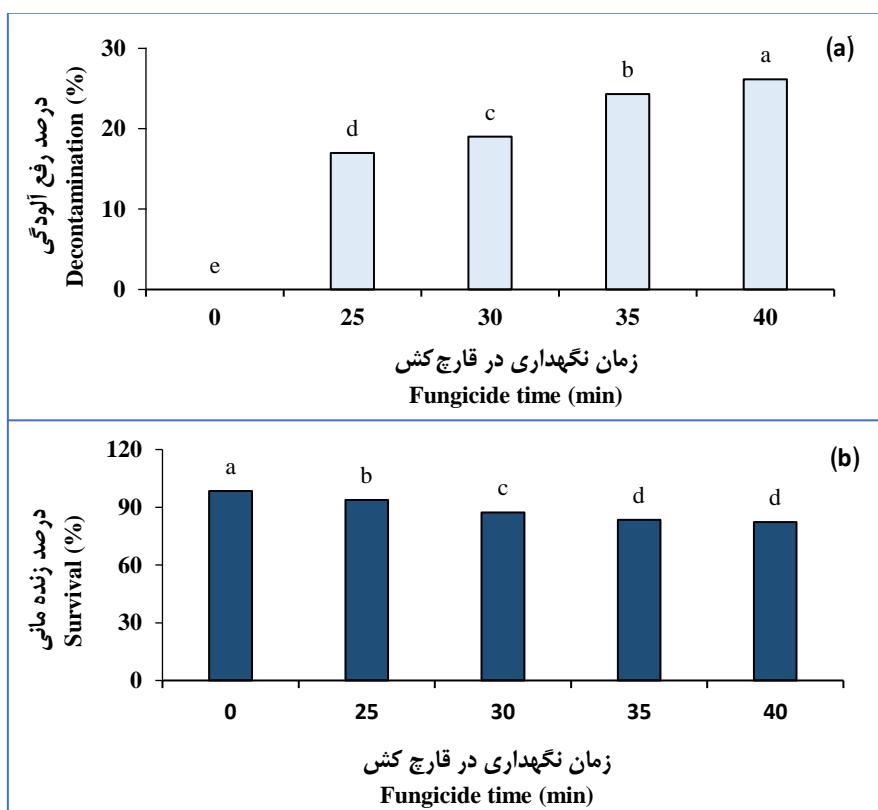
آزمایش پنجم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه (شاهد فقط آب مقطر)، ۰/۱ و ۰/۲ درصد به‌مدت هفت دقیقه برای ضدعفونی قرار گرفت.

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

Table 1- ANOVA for the effect of soaking time in Carbendazim fungicide for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	1.9500	13.0086
زمان Time	4	322.7666**	141.6773**
خطا Error	8	0.6166	2.2428
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, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ۱- تأثیر زمان نگهداری در قارچ کش کاربندازیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 1- The effect of soaking time in carbendazim fungicide for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

جهت حذف قارچ‌های داخلی مفید می‌باشد. محققین گزارش کردند که استفاده از تیمارهای قارچ کش (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

از آنجایی که کاربندازیم، قارچ‌کشی سیستمیک و عمومی است، در طیف وسیعی برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های گیاهی در محصولات زراعی، باغی و زینتی استفاده می‌شود. کاربندازیم به صورت پودر خاکستری رنگ است و قابلیت حلالیت بالایی در آب دارد. این قارچ‌کش به سرعت از طریق برگ و ریشه توسط گیاه جذب می‌شود، لذا

ثانیه بود که سبب مهار آلودگی بیشتر و آسیب کمتر ریزنمونه‌ها گردیده و قدرت رشد و باززایی را حفظ کرد (شکل ۲). گزارش شده است که استفاده از الکل ۷۰ درصد برای گندزدایی ریزنمونه‌ها، سبب حذف لایه روی سطح کوتیکول شده و در نتیجه، محلول ضدعفونی‌کننده اصلی می‌تواند قدرت نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت نمونه‌ها داشته باشد (Harum, 2013). از آنجایی که 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 ریززادی و کشت بافت محسوب می‌شود (Silva & 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 به‌تنهایی یا همراه با هیپوکلریت سدیم از جمله موادی هستند که به‌صورت بسیار متداول مورد استفاده قرار می‌گیرد (Karaoğlu et al., 2006). پژوهش‌های قبلی نشان داده اند، الکل ماده‌ای دهیدراته‌کننده می‌باشد که باعث تخریب غشای سلولی، واسرشت شدن سریع پروتئین‌ها و در ادامه برهم‌خوردن سوخت و ساز سلول می‌شود (Cowan, 1999). از الکل ۷۰ درصد برای ضدعفونی بذره‌های زوفا و ریجان 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).

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) 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 تأثیر منفی بر باززایی ریزنمونه‌ها داشت، روش‌های مختلف ضدعفونی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل آلودگی در محیط درون شیشه ای 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).

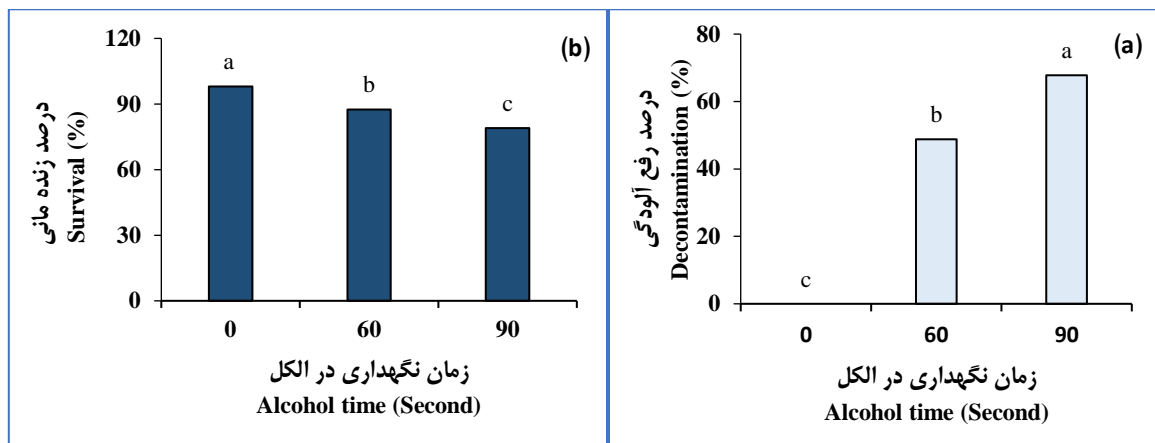
تأثیر زمان نگهداری در الکل بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

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 کاملاً از بین رفت (شکل ۲ ب). بر همین اساس، بهترین زمان نگهداری در الکل برای گندزدایی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون ۶۰

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون
Table 2- ANOVA for the effect of soaking time in Alcohol for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	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, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ۲- تأثیر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون
 Figure 2- The effect of soaking time in alcohol for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

سدیم سه 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). هنگامی که هدف کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی می‌تواند لطمه‌های جبران ناپذیری به آن وارد آورد (Hosseini & Alizadeh, 2013). برای گندزدایی سطحی عموماً از هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای کنترل آلودگی‌های داخلی و خارجی مؤثر هستند. آلودگی‌های داخلی معمولاً چندین هفته بعد از کشت ظاهر می‌شوند. این آلودگی‌ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، اما بر رشد، تقسیم و سبز شدن ریزنمونه‌ها تأثیر می‌گذارند (Reed et al., 1995).

تأثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و

زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

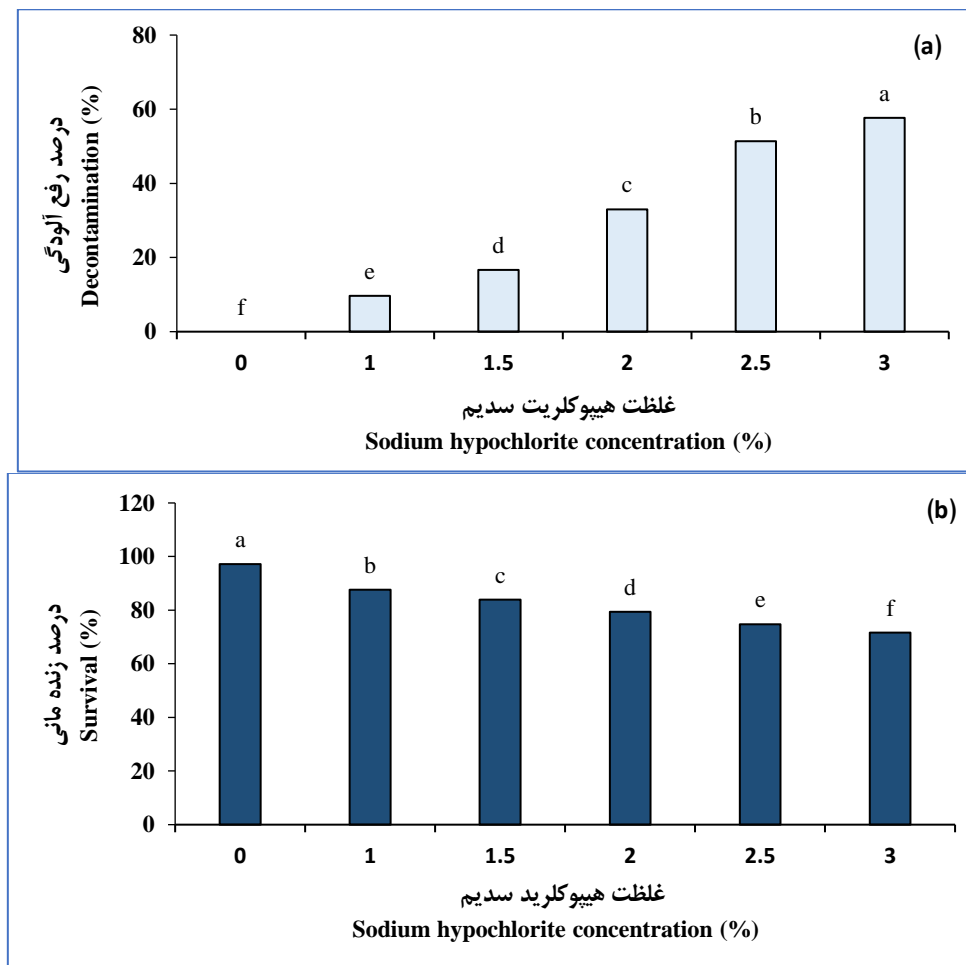
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). استفاده از غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم آلودگی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را مهار کرد و کاربرد هیپوکلرید سدیم سه درصد بیشترین تأثیر را در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

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

Table 3- ANOVA for 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 squares	
		رفع آلودگی Decontamination	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, **, * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.
 ns, ** and *: non-significant, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 3- The effect of different concentrations of sodium hypochlorite for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

تأثیر زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و

زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

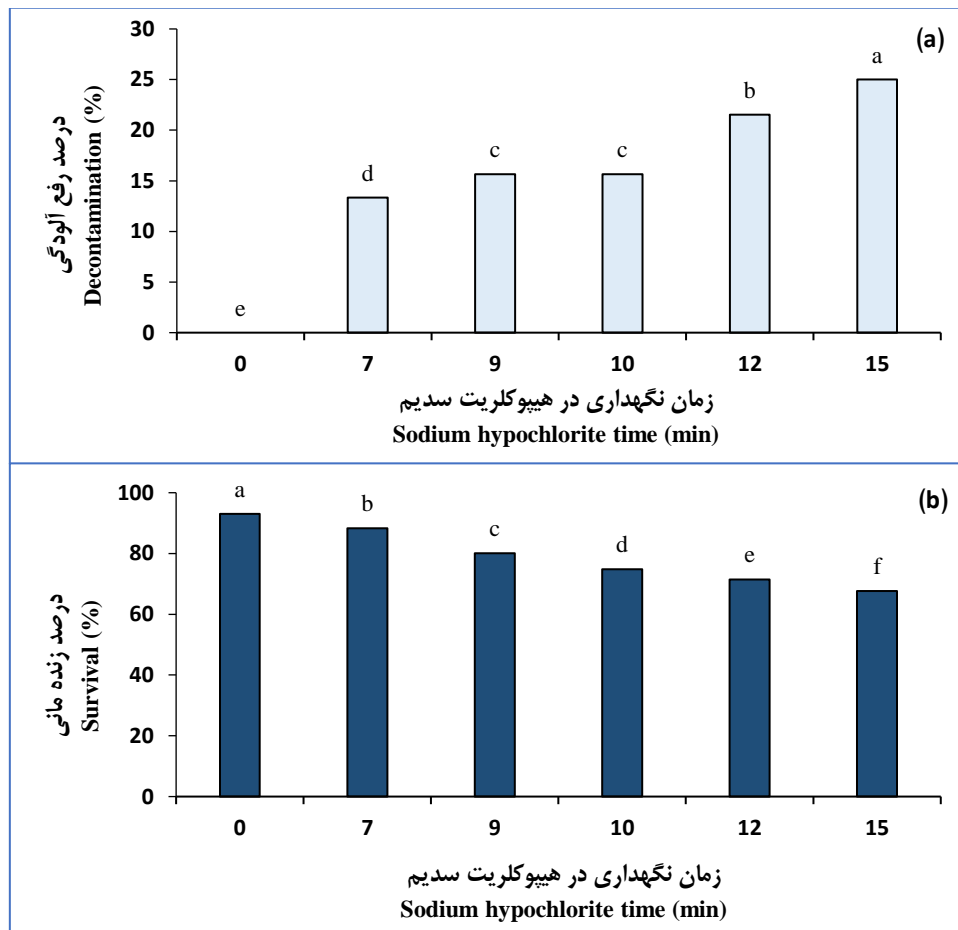
طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۴). افزایش مدت زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم از ۷ به ۱۵ دقیقه منجر به افزایش ۸۷/۵۴ درصدی در مهار آلودگی پیاز لاله واژگون گردید (شکل ۴ الف). با افزایش زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم درصد زنده‌مانی پیازها کاهش یافت و کمترین میزان باززایی ریزنمونه‌های پیاز در زمان نگهداری به مدت ۱۵ دقیقه مشاهده شد، به طوری که باعث قهوه‌ای 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).

هیپوکلریت سدیم بر ضدعفونی برخی از ارقام آلسترومریا مؤثر بوده است، با این وجود در بعضی از ارقام نیز تأثیر 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 به عنوان سفیدکننده تجاری شناخته شده است، به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Smith, 2013). هیپوکلریت سدیم در برابر همه انواع باکتری‌ها قارچ‌ها و ویروس‌ها مؤثر است و با استفاده از اکسید کردن مولکول‌های زیستی مانند پروتئین، میکروب‌ها را می‌کشد (Yildiz & Er, 2002). یکی از موانع تکثیر گیاه زینتی نرگس طی شرایط کشت درون شیشه‌ای ای مهار آلودگی آن می‌باشد. طبق یافته‌های پیشین، کاربرد هیپوکلریت سدیم به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای منجر به کاهش یا حذف آلودگی در ریزنمونه‌های گیاه نرگس گردید (Yildiz & Er, 2002).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های لاله واژگون
Table 4- ANOVA for the effect of storage time in sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	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, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ۴- تأثیر زمان‌های مختلف تیمار هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون
Figure 4- The effect of different times of sodium hypochlorite for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

در آزمایشی تحت عنوان تیمارهای بذر برای مدیریت بیماری باکتریایی لکه‌برگی، کاربرد هیپوکلریت سدیم با غلظت دو و پنج 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 یک درصد برای ۱۵ دقیقه توانست آلودگی باکتریایی را به میزان دو درصد کاهش دهد (Pernezny *et al.*, 2002).

تأثیر 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 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 مهارکننده 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 مؤثرترین تیمار بود (شکل ۵).

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 ضدعفونی‌کننده 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 به نظر 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 گندزایی 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 & Al-*Ani*, 2016). برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها، 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 به‌طور متعادل با توجه به نوع ریزنمونه تعیین گردد (Khatibzadeh *et al.*, 2013).

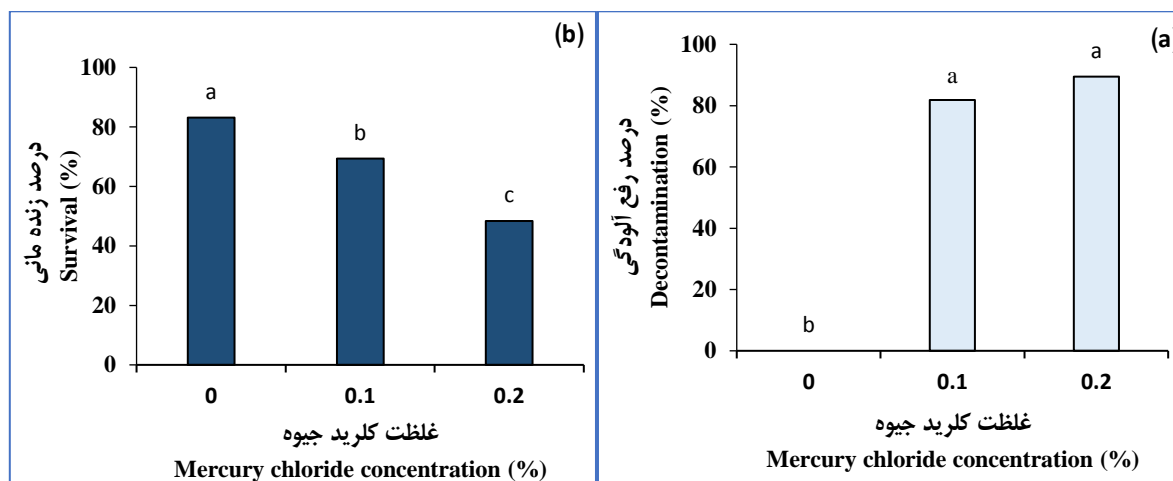
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

Table 5- ANOVA for the effect of different concentrations of Mercury chloride for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	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, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون
 Figure 5- The effect of different concentrations of mercuric chloride on decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

همچنین، کلرید جیوه ۰/۱ درصد مؤثرترین تیمار ضدعفونی در کنترل آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های آلوئه‌ورا است (Saggo & Kaur, 2010) که با نتایج این پژوهش هم‌سویی دارند. در آزمایشی از کلرید جیوه ۰/۱ درصد برای کاهش آلودگی ریزنمونه حاصل از گره گیاه همیشه‌سبز چند ساله *Operculina turpethum* استفاده نموده و نتایج مثبتی از نظر کنترل آلودگی گزارش کردند. به نظر می‌رسد که در گیاه آلسترومریا غلظت بالاتر از ۰/۱ درصد باعث مرگ ریزنمونه‌ها می‌شود و استفاده از غلظت‌های کمتر و زمان‌های کوتاه‌تر می‌تواند راه حلی 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 سه درصد به مدت ۱۵ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۲ درصد به دست آمد؛ اما درصد زنده‌مانی و قابلیت باززایی نمونه‌ها را به‌طور قابل توجهی کاهش داده و

کلرید جیوه به‌عنوان یک ضدعفونی کننده سطحی عمدتاً 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 می‌کند، اما درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های گل نیلوفر را کاهش داد، به‌طوری‌که در یکی از ارقام باعث مرگ کامل ریزنمونه‌ها شد. به نظر 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 به ۰/۱ درصد، رشد گیاهچه‌ها کاهش یافت؛ به‌طوری‌که در تیمار ۰/۱ درصد، ریزنمونه‌ها فقط سبز شدند و به‌ندرت شاخه تولید کردند. همچنین، ریزنمونه‌هایی که در غلظت ۰/۰۳ درصد کلرید جیوه ضدعفونی شده بودند، شاخه‌هایی تولید کردند که از لحاظ ظاهری ضعیف‌تر بوده و به‌سختی ریشه تولید می‌کردند. در گل پربوش علی‌رغم کنترل کامل آلودگی ریزنمونه‌ها، تمام غلظت‌های اعمال شده باعث عدم رشد ریزنمونه‌ها شد. آزمون تترازولیوم، مرگ ریزنمونه‌ها را تأیید نمود (Sain & Sharma, 2013). گزارش‌هایی در مورد تأثیر کلرید جیوه بر مرگ ریزنمونه‌ها وجود دارد. در پژوهشی، استفاده از غلظت ۰/۱ درصد کلرید جیوه در زمان‌های متفاوت برای سنجش میزان آلودگی، زنده‌مانی و مرگ‌ومیر 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 یک دقیقه، با هیپوکلرید سدیم سه درصد و زمان نه دقیقه بود (Shamsian et al., 2016).

شده جهت مهار آلودگی و تکثیر بهینه پیازهای گیاه لاله واژگون توصیه می‌گردد.

سیاسگزاری

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

باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردید. بر همین اساس، کاربرد قارچ-کش ۰/۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلیت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به ترتیب 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

References

- 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, Iran.
- 3- Ahmadi, E., Nasr, S.M.H., Jalilvand, H., & Savadkoobi, 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. <https://doi.org/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., & Venkatsubaiiah, 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), 556-582.
- 11- Gholami, M. (2007). *Micropropagation of of inverted tulip (Fritillaria imperialis L.)*. Doctoral Dissertation, M.Sc. 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. <https://doi.org/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., Sarihan, E., & Khawar, K. M. (2006, October). *In vitro* micropropagation of saffron. In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology*, 739 (223-227). <https://doi.org/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, Mashhad, Iran. (In Persian).

- 18-Khatibzadeh, R., Azizi, M., Arouiee, H., & 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. <https://doi.org/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. <https://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 and 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), <https://doi.org/10.22059/ijhs.2017.230135.1219>
- 28-Saggo, 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 and applied bioscience *Catharanthus roseus* (an anti-cancerous drug yielding plant)—A review of potential therapeutic properties. *International Journal of Pure and 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). <https://doi.org/10.2478/botlit-2014-0014>
- 32-Smith, R.H. (2013), Amsterdam Academic Press, *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. pp. 188, £54.99. ISBN 978-012-415920-4.
- 33-Teixeira da Silva, J.A., & 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. <https://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>