Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Ecology of Iranian Forests, Vol. 13, Issue 2, 2025 p: 116-129

OPEN ACCESS

Research Paper

Contamination Control of Leaf and Petiole Explants of Red Maple (*Acer rubrum* L.) *in Vitro*

Sheyda Amirian[1], Seyed Mohammad Hosseini Nasr[2], Hamid Jalilvand[3], and Akram Ahmadi [4]

1- Ph.D. student in Forest Biological Sciences, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran, (Corresponding author: Hamirian68@gmail.com)
2- Associate Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3- Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
4- Research Assistant Professor, Department of Natural Resources Research, Golestan Province Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran

Received: 25 January, 2025 Revised: 10 April, 2025 Accepted: 20 May, 2024

Extended Abstract

Background: The standing red maple (*Acer rubrum*) is native to the northeastern United States of America for various reasons, including the beauty of colored leaves, being suitable and widely used for urban green space design, resistance to cold, humidity, and drought tolerance, and ecological characteristics, and a wide ability to be compatible with different types of soil. It is one of the imported species of maple in Iran, which is difficult to reproduce through seeds and cuttings in high production, and has not yielded favorable results at a high scale due to the limitations created in terms of the season and the number of cuttings. Unfortunately, the success of laboratory cultivation methods is always hampered by microbial contamination, while contamination-free cultivation is a prerequisite for the success of laboratory-based plant biotechnology. Therefore, surface disinfection is a vital step in preparing healthy and living explants in tissue culture. Most surface contamination can be removed by disinfecting the surface with a suitable disinfectant. Very few studies have been conducted in the field of preparing different sterile explants in the red maple genus. Therefore, this study aimed to provide an optimal disinfection method for the micropropagation of the commercial species of red maple.

Methods: First, treatments were selected through library studies and a literature review. The required plant resources were obtained from seed organs, leaves, and petioles of one to three-year-old young red maple seedlings from Shahsavar City, Mazandaran Province, and the research procedures were carried out in the tissue culture laboratory of the Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center. Then, a culture medium was prepared in six replicates of each treatment. In the next step, the required explants were separated from the mother base, and after removing the damaged explants or those with signs of fungal contamination, they were initially washed using a 500 cc container of Teepol and 0.04% benomyl fungicide, and transferred under a laminar air flow to continue the disinfection process. The treatments were applied separately, the explants were cut into 1-cm pieces, and cultivated in jam glass containers using tweezers and scalpels with at least 20 cc of the intended culture medium. Then, samples were transferred to a growth chamber (12 hours light and 12 hours dark) in optimal environmental conditions with a temperature of 25 °C, and their contamination level was examined after 7 days of cultivation. Statistical analysis was based on a factorial experiment as a completely randomized design with three types of explants, two types of culture media, and 13 treatments. Each treatment was cultivated in six replications, and three explants were cultivated in each replication. Finally, the data were analyzed using SPSS software.

Results: The sources of changes investigated in the experiment were statistically different from each other at the level of 0.01%. In this study, fungal infections were diagnosed by the morphological method and with the naked eye, showing that the fungal diseases were caused by *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cryptococcus* sp., *Mucur* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., and *Pythium* sp. Based on the results of average comparisons, the rate of growth and spread of fungi in the PDA culture medium (83.2%) showed more contamination than in the MS culture medium (76.5%). A comparison of the contamination rate of the explants revealed that the petiole explant

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]

[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

Copyright ©2025 Amirian et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 Unported License, which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

showed signs of contamination (59.6%) less than those of the leaf (8%) and the seed (96.2%). Among all the applied treatments, one drop of Teepol (two minutes) + benomyl fungicide (four g/liter) (25 min) + 75% alcohol (60 sec) + 25% sodium hypochlorite (15 min) + 0.1% mercury chloride (5 min) was determined as the best treatment for the decontamination of red maple explants for use in red maple micropropagation in Golestan Province, Iran.
Conclusion: Maintaining disinfection conditions is a new, definite prerequisite for the successful reproduction of species in laboratory conditions. In the cultivation of ornamental species, such as red maple, which is aimed at commercial plant propagation, the control of contamination and preparation of sterile explants are of paramount importance due to the high volume of work, because the smallest contamination in the explant quickly reproduces in the environment and causes high financial damage, which is often not possible to compensate. In the present study, the use of disinfectants as a combination of (Tipol (2 min) + benomyl fungicide (4 g/L) (25 min) + 75% alcohol, 60 sec + sodium hypochlorite 25% (15 min) + 0.1% mercury chloride (5 min) had a greater effect on controlling the fungal infection of red maple seedlings. In the present study, using these substances alone or in combination with another substance does not generally have a significant effect on the decontamination of the red maple cultivation environment. The use of these materials is one of the most important controlling methods for bacterial and fungal contamination in red maple glass culture.

Keywords: *Acer rubrum*, Disinfection protocol, $HgCL_2$, Tissue culture

How to Cite This Article: Amirian, SH., Nasr, S. M. H., Jalilvand, H., & Ahmadi, A. (2025). Contamination Control of Leaf and Petiole Explants of Red Maple (*Acer rubrum* L.) *in Vitro*. *Ecol Iran For*, 13(2), 116-129. DOI: 10.61882/ifej.2025.528

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]

[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

OPEN ACCESS

مقاله پژوهشی

کنترل آلودگی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ افرای قرمز (*Acer rubrum* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

شیدا امیریان[۱]، سیدمحمد حسینی نصر[۲]، حمید جلیلوند[۲] و اکرم احمدی[۳]

۱- دانشجوی دکتری علوم زیستی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، (نویسنده مسوول: Hamirian68@gmail.com)
۲- دانشیار، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳- استاد، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰
صفحه ۱۱۶تا ۱۲۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: افرای قرمز ایستاده (*Acer rubrum*) بومی شمال شرق ایالات متحده آمریکا به دلایل مختلفی از جمله زیبایی برگ‌های رنگی، مناسب و پرکاربرد بودن برای استفاده در طراحی فضای سبز شهری، مقاومت در برابر سرما، رطوبت و تحمل خشکی و ویژگی‌های اکولوژیکی و توانایی گسترده برای سازگاری با انواع مختلف خاک، یکی از گونه‌های وارداتی جنس افرا در ایران است. تکثیر این گونه از طریق بذر و قلمه در تولیدات با تعداد بالا دشوار است و به‌دلیل محدودیت ایجادشده از نظر فصل و تعداد قلمه، نتایج مطلوبی در مقیاس بالا به‌همراه ندارد. متاسفانه، موفقیت روش‌های کشت آزمایشگاهی همیشه به‌دلیل آلودگی میکروبی مختل می‌شود، در حالی‌که کشت بدون آلودگی یک پیش‌نیاز برای موفقیت بیوتکنولوژی گیاهی مبتنی‌بر آزمایشگاه است. از این‌رو، ضدعفونی سطحی گامی حیاتی در تهیه ریزنمونه‌های سالم و زنده در کشت بافت است. اکثر آلودگی‌های سطحی را می‌توان با ضدعفونی کردن سطح با یک ماده ضدعفونی کننده مناسب از بین برد. از آن‌جایی که مطالعات صورت‌گرفته در زمینه تهیه ریزنمونه‌های مختلف استریل در جنس افرای قرمز بسیار اندک هستند، این مطالعه با هدف ارائه یک روش ضدعفونی بهینه جهت ریزازدیادی گونه تجاری افرای قرمز انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا، تیمارهای مورد آزمایش از طریق مطالعات کتابخانه‌ای و بررسی پیشینه تحقیق انتخاب شدند. سپس، منابع گیاهی مورد نیاز از اندام‌های بذر، برگ و دمبرگ نهال‌های جوان یک تا سه ساله افرا قرمز از استان مازندران، شهرستان شهسوار تهیه شدند و مراحل پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان انجام گرفتند. سپس، محیط کشت‌ها در شش تکرار از هر تیمار تهیه شدند. در مرحله بعد، ریزنمونه‌های مورد نیاز از پایه مادری جدا شدند و پس از حذف ریزنمونه‌های مخدوش یا دارای علائم قارچ‌زدگی، با استفاده از ظرف ۵۰۰ سی‌سی شستشوی اولیه با استفاده از تیپول و قارچ‌کش بنومیل ۰/۰۴ درصد انجام گرفت. سپس، آنها به زیر هود لامینار انتقال یافتند و ادامه مراحل ضدعفونی در آن‌جا انجام شد. تیمارها به‌صورت جداگانه اعمال و ریزنمونه‌ها پس از برش به قطعات یک سانتی‌متری با استفاده از پنس و اسکالپل، درون ظروف شیشه مربایی با حداقل ۲۰ سی‌سی محیط کشت موردنظر کشت شدند. پس از انتقال به قفسه نوری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) در شرایط محیطی بهینه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند و پس از گذشت هفت روز از کشت، میزان آلودگی آن‌ها مورد بررسی قرارگرفت. آنالیز آماری بر پایه آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه نوع ریزنمونه بود که در آن، دو نوع محیط کشت و ۱۳ تیمار که هر تیمار در شش تکرار و در هر تکرار سه قطعه ریزنمونه کشت شد. در نهایت، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند.

یافته‌ها: منابع تغییرات مورد بررسی در آزمایش در سطح ۰/۰۱ درصد با یکدیگر اختلاف آماری داشتند. در مطاله حاضر، آلودگی‌های قارچی به‌روش مورفولوژیکی و با چشم غیرمسلح تشخیص داده شدند که نشان داد عوامل بیماری قارچی از جنس‌های *Penicillium* sp.، *Aspergillus* sp.، *Cryptococcus* sp.، *Mucur* sp.، *Rhizopus* sp.، *Fusarium* sp. و *Pythium* sp. بودند. بر اساس نتایج مقایسات میانگین، میزان رشد و گسترش قارچ در محیط کشت PDA با ۸۳/۲ درصد، آلودگی بیشتری نسبت به محیط کشت MS با ۷۶/۵ درصد نشان داد. مقایسه میزان آلودگی ریزنمونه‌های به‌کار رفته نشان داد که ریزنمونه دمبرگ با علائم آلودگی (۵۹/۶ درصد) آلودگی کمتری نسبت به برگ (۸ درصد) و بذر (۹۶.۲ درصد) نشان دادند. از بین تمامی تیمارهای اعمال شده، بهترین تیمار جهت رفع آلودگی ریزنمونه‌های افرای قرمز جهت استفاده در ریزازدیادی افرای قرمز در ایران، استان گلستان، (یک قطره تیپول (۲ دقیقه) + قارچ‌کش بنومیل (۴ گرم بر لیتر) (۲۵ دقیقه) + الکل ۷۵ درصد، (۶۰ ثانیه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد، (۱۵ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) تعیین شد.

نتیجه‌گیری: حفظ شرایط ضدعفونی یک پیش‌نیاز قطعی جدید تکثیر موفق گونه‌ها در شرایط آزمایشگاهی است. همچنین، در کشت‌بافت گونه‌های وارداتی و تزئینی مانند افرای قرمز که هدف تکثیر تجاری گیاه باشد، کنترل آلودگی‌ها و تهیه ریزنمونه استریل به‌دلیل حجم بالای کار، اهمیتی دوچندان می‌یابد زیرا کوچک‌ترین آلودگی در ریزنمونه به‌سرعت در محیط تکثیر می‌شود و خسارت مالی زیادی را به‌همراه می‌آورد که غالباً جبران آن ممکن نیست. در پژوهش حاضر، استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده به‌صورت ترکیبی از (تیپول (۲ دقیقه) + قارچ‌کش بنومیل (۴ گرم بر لیتر) (۲۵ دقیقه) + الکل ۷۵٪، ۶۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) تاثیر بیشتری در کنترل آلودگی قارچی ریزنمونه‌های افرای قرمز دارد. به‌طور کلی، در پژوهش حاضر کاربرد هر یک از این مواد به‌تنهایی یا ترکیب با یک ماده دیگر اثر چشم‌گیری بر رفع آلودگی محیط کشت افرای قرمز ندارد. استفاده از این مواد یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی در کشت درون‌شیشه‌ای افرای قرمز است.

واژه‌های کلیدی: پروتکل ضدعفونی، افرا قرمز، $HgCL_2$، کشت بافت

مقدمه

جنس *Acer* که براساس منابع، در خانواده *Sapindaceae* و زیرخانواده *Hippocastanoideae* جای گرفته است (Mohamadzadeh Moghadam & Hamidi, 2017)، دارای ۸۰ گونه در سطح جهان است (Sabeti, 1993). این جنس در ایران دارای ۱۰ گونه است که در جنگل‌های شمال و غرب گسترش دارد و با توجه به زیر گونه‌ها و رویشگاه آن‌ها، با عناوین کرکو، کی‌کف یا کیکم کردستانی (subsp *Assyriacum*)، کهوک یا کیکم قفقازی (subsp *Ibericum*)، سیاه کرکو یا کیکم ترکمنی (subsp *Turcomanicum*)،

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]

[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

کیکم شیرازی (subsp *Cinerascens*) و ککم یا کیکم ایرانی (subsp *Persicum*) که انحصاری ایران شناخته می‌شوند و اغلب آن‌ها به‌صورت بومی در جنگل‌های کشور وجود دارند (Sabeti, 1993).

تعداد محدودی از گونه‌های وارداتی افرا، مانند افرای قرمز ایستاده (*Acer rubrum*) در پارک‌ها و سایر نقاط کشور کشت شده‌اند (Borhani & Mousazadeh, 2008). افرای قرمز بومی شمال شرق ایالات متحده آمریکا است. به‌دلیل زیبایی برگ‌های رنگی، در برابر سرما، رطوبت و تحمل خشکی، ویژگی‌های اکولوژیکی و توانایی گسترده برای سازگاری با انواع مختلف خاک، یک گونه عالی زینتی است که ارزش تجاری نیز دارد (Fadhaladeen *et al*., 2021). از آنجایی که انتخاب گونه‌های گیاهی مناسب نقش مهمی در گسترش و پایداری فضای سبز شهری دارد (Ghasemi Aghbash *et al*., 2023)، نهال‌های افرای قرمز نیز به‌دلیل زیبایی کم‌نظیر یکی از محبوب‌ترین، پرفروش‌ترین و پرکاربردترین گونه‌های زینتی در برنامه‌ریزی طراحی منظر شهری محسوب می‌شود (Li *et al*., 2017).

تکثیر افرای قرمز از طریق بذر در اغلب موارد نتیجه دلخواه را ندارد. استفاده از قلمه و سایر روش‌های تکثیر رویشی با توجه به فصل و تعداد قلمه لازم، محدود می‌شود. از طرفی، برآوردن نیازهای تولید انبوه با تکثیر از طریق قلمه در مقیاس کوچک دشوار است. همچنین به‌دلیل عوامل محیطی، معرفی گونه‌های درختی با برگ‌های رنگی اغلب با مشکل رنگ ناپایدار برگ و تنوع صفات نتاج همراه است (Lin *et al.,* 1997)؛ لذا تکثیر غیرجنسی از طریق کشت بافت، برای این گونه توجیه‌پذیر است.

عوامل متعددی می‌توانند در ریزازدیادی گیاهان مشکل‌آفرین باشند که برخی از این عوامل آلودگی‌های سطحی و درونی ریزنمونه‌ها، آلودگی‌های مربوط به محیط کشت، آلودگی‌های مربوط به ابزار و تجهیزات و آلودگی‌های مربوط به‌عدم حرفه‌ای بودن اپراتور هستند (Emam, 2018). هنگامی که هدف کشت بافت، تکثیر تجاری گیاهان باشد، کنترل آلودگی و تهیه ریزنمونه استریل از اهمیت زیادی برخوردار است و استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده از مهم‌ترین روش‌های کنترل آلودگی است (Son *et al*., 2011).

عوامل مختلفی روی نوع و میزان آلودگی ریزنمونه‌ها مؤثر هستند که از آن جمله می‌توان به سن پایه مادری، محل قرارگیری نمونه روی پایه، فصل برداشت نمونه و مختصات جغرافیایی و اکولوژیکی رویشگاه گیاه مورد نظر اشاره کرد (Hathaway *et al*., 2020). با توجه به قرار گرفتن درختان در عرصه (جنگل، مرتع، فضای سبز مصنوعی و دست‌کاشت) و آلودگی سطحی اندام‌ها به انواع پاتوژن‌های محیطی، هدف از تیمارهای ضدعفونی در کشت بافت، حذف آلودگی‌های ریز نمونه بدون صدمه زدن به بافت آن است (Emam, 2018; Mohammadzadeh *et al*., 2019).

در گزارشی، مشکلات ریزازدیادی در مرحله ضدعفونی، شامل درگیر بودن ریزنمونه‌های کشت‌شده با آلودگی نهان یا داخلی و نیز قهوه‌ای شدن نمونه‌ها بر اثر ترشح مواد فنولی از آن عنوان می‌شود (Emam, 2018).

آلودگی نهان یا داخلی با تیمارهای ضدعفونی معمول برطرف نمی‌شود و منجر به رشد ضعیف یا کلروز بافت‌ها می‌شود (Alam *et al*., 2010).

به‌همین دلیل، استفاده صحیح و به‌موقع از محلول‌های سترون‌کننده مختلف مانند انواع قارچ‌کش‌ها، ترکیبات کلردار نظیر کلرید جیوه و هیپوکلریت سدیم برای کاهش این آلودگی‌ها، ضروری به‌نظر می‌رسد (Emoghene *et al*., 2020). برای ضدعفونی سطحی عموماً از الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم و کلرید جیوه استفاده می‌شود (Son *et al*., 2011). ریزنمونه‌های دارای قطعات چوب، کامبیوم و پوست به‌روش شستشو با الکل و به‌دنبال آن شعله‌دادن ضدعفونی می‌گردند. از طرفی، برای بافت‌هایی که توسط بافت حفاظتی احاطه نشده‌اند، ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یا کلیسم به‌جای شعله دادن کاربرد دارد. گاهی اوقات نیز به‌دلیل حساسیت بافت‌ها و گونه‌ها به هیپوکلریت از غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای این منظور استفاده می‌شود (Emoghene *et al*., 2020).

ریزنمونه بافت مریستمی است که از گیاه مادر استخراج می‌شود و به‌عنوان ماده اولیه برای شروع کشت‌های آزمایشگاهی به کار می‌رود. به‌طورکلی، بذر ارجح‌ترین ریزنمونه برای کشت بافت گونه‌های درختی است زیرا جنین زیگوتیک (که در اندوسپرم و پوشش بذر محصور شده‌است) یکی از جوان‌ترین بخش‌های گیاه است که پتانسیل بسیار زیادی برای باززایی از خود نشان می‌دهد (Pant & Husen, 2022). در پژوهشی با هدف یافتن بهترین ریزنمونه و فصل نمونه‌برداری تحت تأثیر تیمارهای مختلف ضدعفونی جهت دستیابی به دستورالعمل بهینه برای پژوهش‌های کشت بافت شمشاد خزری، ریزنمونه‌های برگ و ساقه تحت ۱۳ تیمار مختلف ضدعفونی به کار گرفته شدند و نتایج نشان دادند که ریزنمونه‌های فصل بهار نسبت به ریزنمونه‌های فصل پاییز دارای آلودگی میکروبی کمتری بودند (Mohammadzadeh *et al*., 2019). از طرفی، ریزنمونه‌های برگی نسبت به ریزنمونه‌های ساقه درصد آلودگی کمتری از خود نشان دادند. همچنین، ابراهیمی و همکاران در پژوهشی با عنوان بهینه‌سازی باززایی مستقیم گون (*Astragalus verus*) در شرایط درون‌شیشه‌ای بیان کردند که پروتکل ضدعفونی به‌ترتیب شامل جمع‌آوری بذرهای سالم از درون بوته گیاه، شستشو در آب جاری، قرارگرفتن در الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و در نهایت، استفاده از هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه بود (Ebrahimi *et al*., 2018).

محقق دیگری در ریزازدیادی افرا کیکم با هدف تعیین محیط کشت بهینه برای باززایی افرا کیکم از طریق کشت بافت و تعیین تیمارهای ضدعفونی‌کننده مؤثر، عنوان کرد که محلول ۰/۵ درصد قارچ‌کش به‌مدت ۱۰ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۲۰ دقیقه تیمار مؤثرتری جهت جلوگیری از آلودگی ریزنمونه‌های بذر و جوانه بود (Ebrahimi *et al*., 2018).

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

برخی متخصصین کشت بافت گیاهی در ریزازدیادی افرای قرمز از طریق کالوس جنینی از چهار ریزنمونه شامل برگ‌های ترد و تازه، شاخه‌ها (تقریباً ۱۵ روز پس از جوانه‌زنی) همراه با جوانه، شاخه‌های بدون جوانه و شاخه‌های سخت به عنوان ریزنمونه استفاده کردند. مراحل ضدعفونی در پژوهش آنان شامل قرار گرفتن در زیر آب جاری به مدت ۲۰ دقیقه، غوطه‌وری در تیپول به‌مدت ۵ دقیقه، تیمار با الکل ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، تیمار با کلرید جیوه به مدت ۸ دقیقه و شش بار با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند (Dai *et al*., 2020).

تأثیر دو عامل ضدعفونی سطحی (هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه) در ریزنمونه برگ ژربرا (*Gerbera jamesonii* Bolus) در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و اعلام شد که بهترین تیمار ضدعفونی برای این گونه ترکیبی از کلریدجیوه ۰.۱ درصد و هیپوکلریدسدیم چهار درصد به‌مدت ۳ دقیقه بود (Kumar *et al*., 2021). در یک مطالعه آزمایشگاهی دیگر برای دست یافتن به یک پروتکل بهینه ریزازدیادی برای افرای قرمز در کردستان عراق، شیوه ضدعفونی ریزنمونه‌های مورد استفاده شامل شستشوی قلمه‌های دارای جوانه با آب لوله‌کشی و محلول تیپول به‌مدت ۴۰ دقیقه، سپس تیمار با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه و سه مرتبه آب کشی با آب مقطر استریل پس از هر مرحله از ضدعفونی، در زیر هود لامینار گزارش شد (Fadhaladeen *et al*., 2021). در مطالعه‌ای، روش ضدعفونی سطحی برای کاهش آلودگی ریزنمونه‌های گره‌ای *Clinacanthus Rhizophora apiculata* شامل Pyroligneous acid (PA)، هیپوکلریت سدیم (Clorox)، تیوفانات متیل (قارچ کش) و کلرید جیوه ($HgCl_2$) بود و گزارش شد که $HgCl_2$ همراه با قارچ‌کش تیوفانات متیل بهترین تیمار کاهش آلودگی قارچی بود و ضدعفونی سطحی با کلرید جیوه (۰/۲ درصد) به‌مدت یک ساعت غلظت و زمان بهینه بود که منجر به بالاترین درصد بقا و زنده ماندن ریزنمونه گرهی این گونه شد (Hashim *et al*., 2021).

در دیگر مطالعات ریزازدیادی گونه‌های جنس افرا، گزارش‌هایی مبنی‌بر وجود آلودگی بالا در کشت درون شیشه‌ای وجود دارند (Emam, 2018; Ghaffar Shahriari *et al*., 2011; Imani *et al*., 2022). مطالعات صورت گرفته در زمینه تهیه ریزنمونه‌های مختلف استریل در جنس افرای قرمز بسیار اندک هستند. لذا هدف از انجام این پژوهش، تعیین بهترین تیمار ضدعفونی جهت از بین بردن آلودگی سطحی ریزنمونه‌های بذر، برگ و دمبرگ گونه افرای قرمز است.

مواد و روش‌ها

گونه مورد مطالعه

گونه مورد مطالعه در این پژوهش، افرای قرمز با نام علمی *Acer rubrum* است که بومی آمریکای شرقی و چین است و در سایرنقاط از جمله ایران به‌صورت درختچه در ایجاد منظر در فضای سبز کاربرد دارد. رقم مورد مطالعه در مراکز فروش آن به افرای قرمز ایستاده مصطلح شده است (شکل ۱).

منابع گیاهی از بذر، برگ و دمبرگ نهال‌های جوان یک تا سه ساله افرا قرمز از استان مازندران، شهرستان شهسوار تهیه شدند. پژوهش حاضر در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان انجام شد. ابتدا نمونه‌های بذر به مدت ۴۸ ساعت در جریان آب ولرم قرار گرفتند تا علاوه بر رفع آلودگی‌های سطحی، بتوان پوسته بیرونی و باله‌ی بذر را به‌راحتی از آن جدا کرد. نمونه‌های مخدوش یا دارای علائم قارچ‌زدگی برگ و دمبرگ نیز پس از نمونه‌برداری از نهال‌ها، حذف شدند و دمبرگ‌ها از برگ‌ها جدا شده، درون بشر ۵۰۰ سی‌سی ریخته، و با آب جاری شسته شدند. سپس، نمونه‌ها با استفاده از یک قطره تیپول به‌مدت دو دقیقه تیمار شدند و آبکشی با آب لوله‌کشی انجام شد سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در محلول قارچ‌کش بنومیل با غلظت چهار گرم بر لیتر قرار گرفتند و مجددا شش مرتبه با آب لوله‌کشی آبکشی شدند.

تیمارهای ضدعفونی‌کننده پس از شستشوی اولیه نمونه‌ها با تیپول و قارچ‌کش بنومیل[1] نمونه‌ها به زیر هود منتقل و تیمارهای تنظیم‌شده در جدول یک اجرا شدند. پس از انجام هر مرحله از تیمار، جهت دفع کامل مواد ضدعفونی‌کننده، نمونه‌ها پنج مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

[1] به‌دلیل مشترک بودن این بخش از ضدعفونی در تمام تیمارها از آوردن آن در جدول خودداری شد.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]

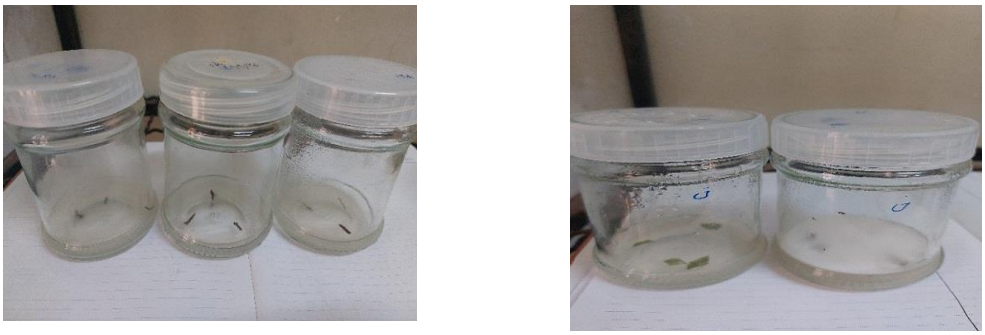
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

شکل ۱- تصویر افرای قرمز ایستاده و بذور آن
Figure 1. *Acer rubrum* and its seeds

جدول ۱- تیمارهای ضدعفونی کننده ریزنمونه‌های بذر، برگ و دمبرگ
Table 1. Sterilization treatments of seed, Leaf, and petiole explants

کد Code	تیمارها Treatments
Aa	تیپول (دو الکل ۷۰٪، ۳۰ ثانیه + آب اکسیژنه 10% (۱۵ دقیقه) Alcohol 70%, 30 seconds + H2O2 10% for 15 minutes
Bb	الکل ۷۵٪ (۶۰ ثانیه) + آب اکسیژنه 10% (۱۰ دقیقه) Alcohol 75%, 60 seconds + H2O2 10% for 10 minutes
Cc	الکل ۷۵٪ (۶۰ ثانیه) + کلرید جیوه، ۰/۰۵ (۵ دقیقه) Alcohol 75%, 60 seconds + mercury chloride, 0.05 (5 minutes)
Dd	الکل ۷۵٪ (۶۰ ثانیه) + کلرید جیوه ۰/۰۵ (۱۰ دقیقه) Alcohol 75%, 60 seconds + mercury chloride 0.05 (10 minutes)
Ee	الکل ۷۵٪ (۳۰ ثانیه) + کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) Alcohol 75%, 30 seconds + mercury chloride 0.1% (5 minutes)
Ff	الکل ۷۵٪ (۶۰ ثانیه) + کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) Alcohol, 60 seconds + 0.1% mercury chloride (10 minutes)
Gg	کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) + آب اکسیژنه ۱۰٪ (۱۵ دقیقه) 0.1% Mercury chloride (5 minutes) + hydrogen peroxide 10% (15 minutes(
Hh	کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) + آب اکسیژنه ۱۰٪ (۱۵ دقیقه) 0.1% Mercury chloride (5 minutes) + hydrogen peroxide 10% (15 minutes)
Ii	الکل ۷۰٪ (۶۰ ثانیه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۵ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) Alcohol 70%, 60 seconds + sodium hypochlorite 25% (5 minutes) + mercury chloride 0.1% (5 minutes)
Jj	الکل ۷۵٪ (۶۰ ثانیه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) Alcohol 75%, 60 seconds + sodium hypochlorite 25% (10 minutes) + mercury chloride 0.1% (5 minutes)
Kk	الکل ۷۵٪ (۳۰ ثانیه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) + آب اکسیژنه ۱۰ درصد (۵ دقیقه) Alcohol 75%, 30 seconds + sodium hypochlorite 25% (15 minutes) + hydrogen peroxide 10% (5 minutes)
Ll	الکل ۷۵٪ (۶۰ ثانیه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۱۵ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) Alcohol 75%, 60 seconds + sodium hypochlorite 25% (15 minutes) + mercury chloride 0.1% (5 minutes)
Mm	الکل ۷۰٪ (۴۵ ثانیه) + هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ (۲۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) Alcohol 70%, 45 seconds + sodium hypochlorite 25% (20 minutes) + mercury chloride 0.1% (5 minutes)

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]



شکل ۲- تصویر نمونه‌های کشت‌شده از ریزنمونه‌های بذر، برگ و دمبرگ افرای قرمز در شیشه مربایی
Figure 2. Cultured samples of seed, leaf, and petiole explants

پس از اعمال تیمارهای ضدعفونی‌کننده (جدول ۱)، ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ با استفاده از پنس و اسکالپل استریل به قطعات یک در یک سانتیمتر برش داده شدند و در ظروف شیشه مربایی حاوی ۲۰ سی‌سی از محیط کشت‌های مورد استفاده شامل PDA و MS، در پنج تکرار کشت شده، در قفسه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند (شکل ۲). بعد از ۳ روز، اولین نشانه‌های آلودگی ظاهر شد و بعد از گذشت ۷ روز میزان آلودگی ریزنمونه‌ها ثبت شد. درصد آلودگی از رابطه یک محاسبه شد.

(رابطه یک)

$$\%C = m/M \times 100$$

C%: درصد آلودگی
M: کل ریزنمونه کشت‌شده در آن تکرار
m: تعداد ریزنمونه آلوده هر تکرار

روش آماری

آنالیز آماری بر پایه آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه نوع ریزنمونه، دو نوع محیط کشت و ۱۳ تیمار بیان شده در جدول یک که هر تیمار در پنج تکرار و در هر تکرار سه قطعه ریزنمونه کشت شد. پس از بررسی معنی‌دار بودن اختلاف منابع تغییرات آزمایش، مقایسه میانگین‌های هر متغیر با روش مقایسه میانگین دانکن در نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر، تلاشی در جهت کاهش آلودگی کشت‌های درون‌شیشه‌ای گونه‌ی افرای قرمز، تحت تاثیر ۱۳ تیمار ضدعفونی‌کننده متنوع و بررسی اثر نوع ریزنمونه و نوع محیط کشت در انتخاب بهینه آن صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده از آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش حاضر، در قالب جداول و نمودارهای زیر ارائه شده‌اند.

نتایج آنالیز واریانس حاصل از بررسی اثر نوع محیط کشت PDA و MS، نوع ریزنمونه شامل برگ، دمبرگ و بذر و تیمارهای مختلف ضدعفونی بر درصد آلودگی کشت‌ها در جدول ۲ ارائه شده‌اند. همان طور که در جدول شماره (۲) مشاهده می‌شود، اثر مستقل نوع محیط کشت، نوع ریزنمونه و تیمارهای ضدعفونی مختلف به‌کار رفته در آزمایش دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر در سطح ۰/۰۱ درصد است.

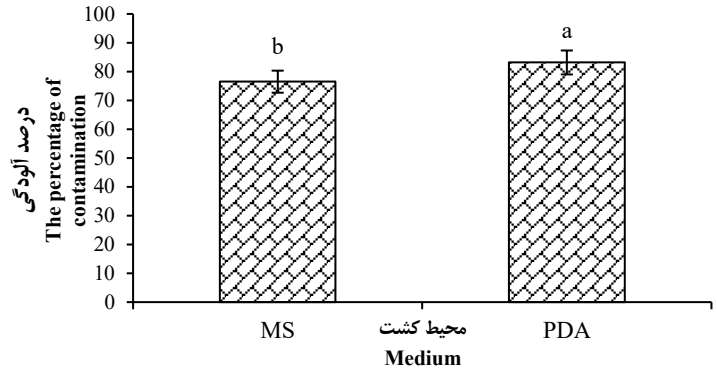
همچنین جدول آنالیز واریانس نشان می‌دهد که تنها اثر متقابل نوع تیمارهای ضدعفونی اعمال شده و نوع ریزنمونه بر درصد آلودگی دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ درصد است. در پژوهش دیگری نیز اختلاف آماری ۰/۰۵ درصد به‌صورت اثر مستقل و متقابل در تمام تیمارهای مورد بررسی گزارش شد (Mohammadzadeh *et al*., 2019). همچنین سون و همکاران (Son *et al*., 2011) اثر مستقل و متقابل تیمار ضدعفونی‌کننده و نوع رقم گونه را در تحقیق خود معنی‌دار بیان کردند.

جدول ۲- تجزیه واریانس حاصل از اثر نوع محیط کشت، نوع ریزنمونه و تیمارهای مختلف ضدعفونی‌کننده بر درصد آلودگی کشت‌ها
Table 2. Analysis of the variance resulting from the effect of the culture medium type, the explant type, and different sterilization treatments on the percentage of culture contamination

معنی‌داری Sig.	آماره f F	میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sum of squares	منبع تغییرات Source of variation
0.00**	27.141	78.000	1	78.000	محیط کشت Medium
0.00**	282.902	813.042	2	1626.083	ریزنمونه Explant
0.00**	62.474	179.454	12	2154.045	تیمار Treatment
0.089ns	2.439	7.010	2	14.019	محیط کشت*ریزنمونه Medium * Explant
0.069ns	1.694	4.868	12	58.417	محیط کشت*تیمار Medium *Treatment
0.000**	25.563	73.465	24	1763.167	تیمار*ریزنمونه Treatment* Explant
0.9 ns	0.769	2.211	24	53.064	محیط کشت *تیمار*ریزنمونه Medium * Treatment* Explant
		2.874	234	672.500	خطا Error
			312	51156.000	کل Total

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت به‌کار رفته بر درصد آلودگی کشت‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای در شکل ۳ ارائه شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، درصد آلودگی کشت‌ها در محیط کشت PDA با ۷۷/۲۱٪ بالاتر از محیط کشت MS با درصد آلودگی ۶۸/۷ است. در پژوهش حاضر، اولین علائم بروز آلودگی در محیط کشت PDA بود و تعداد ریزنمونه‌های آلوده در سطح این محیط کشت بیشتر از محیط کشت MS ثبت شد. در ادامه، رشد و گسترش پرگنه‌های قارچی به‌صورت چشمی بین دو محیط کشت استفاده شده مقایسه شد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که محیط کشت PDA به‌علت وجود نشاسته و گلوکز سهل‌الوصولی که برای میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کند و از طرفی به‌علت تنوع کم مواد موجود در آن، اثر متقابل بازدارنده جهت جذب بهتر مواد مغذی برای میکروارگانیسم‌ها به‌وجود نمی‌آورد و میکروارگانیسم‌ها خصوصاً قارچ‌ها رشد سریع و گسترده‌تری دارند. از طرفی، خدایی و همکاران (Khodaei *et al*., 2009) عامل pH و سایر عوامل مهم محیطی را بر روند رشد میسیلیوم و پرگنه قارچ‌های بیماری‌زا مانند فوزاریوم و گونه‌های مختلف آن موثر دانستند و بیان کردند که بیشترین و کمترین رشد میسیلیوم گونه‌های مختلف فوزاریوم در pH بین ۵/۶ تا ۶/۵ اندازه‌گیری شدند که نشان می‌دهد هر چه مقدار pH کمتر باشد رشد قارچ‌ها به‌راحتی صورت می‌گیرد. مطابق با نتایج تحقیق حاضر، عامل pH نیاز به بررسی بیشتری دارد زیرا قطعا با تعدد قارچ‌های بیماری‌زای شناسایی شده و pH متفاوت در دو محیط کشت به‌کار رفته در تحقیق حاضر، اثر آن بر رشد پرگنه‌ها موثر خواهد بود.



شکل ۳- درصد آلودگی کشت‌ها بر اساس نوع محیط کشت
Figure 3. The contamination percentage of cultures based on the type of the medium

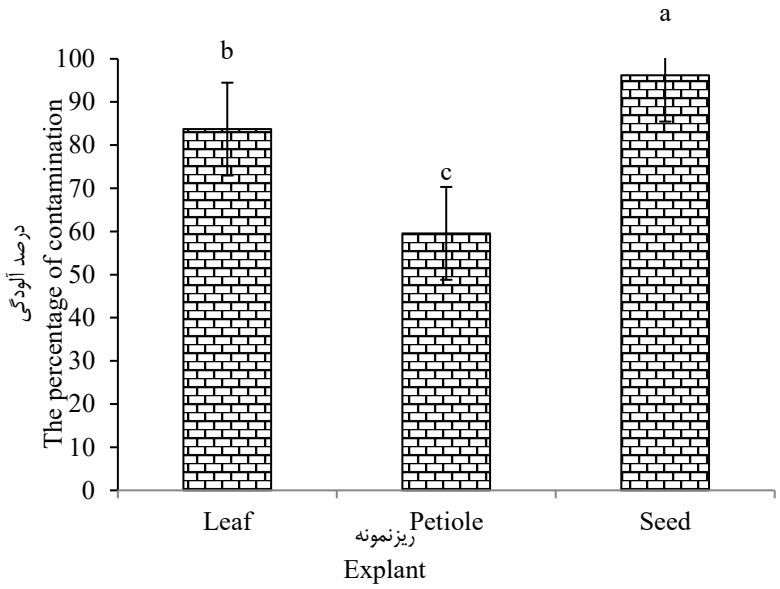
مطابق با شکل ۴، درصد آلودگی کشت‌ها بر اساس نوع ریزنمونه‌ی به‌کار رفته نشان داد که ریزنمونه بذر با ۹۶/۲ درصد، در مقایسه با ریزنمونه برگ با ۸۳/۷ و دمبرگ با ۵۹/۶ درصد آلودگی بیشتری را از خود نشان داد.

آلودگی ریزنمونه‌ها در کشت بافت به‌عوامل مختلفی مانند نوع گونه، سن، فصل نمونه‌برداری و شرایط آب و هوایی بستگی دارد (Read & Preece, 2014). در بررسی این عوامل در پژوهش حاضر، علت آلودگی کمتر ریزنمونه‌های دمبرگ (۵۹/۶ درصد) به برگ (۸۳/۷۲ درصد) می‌توان به سطح مقطع این دو ریزنمونه اشاره کرد که برگ به‌علت سطح مقطع گسترده، قطعاً پذیرای میکروارگانیسم‌های بیشتری به نسبت دمبرگ‌های ظریف و جوان که در پناه برگ‌ها واقع شده‌اند، است و آلودگی میکروبی بالاتری را در محیط کشت به‌وجود می‌آورد (Emam, 2018). به‌همین دلیل، درصد آلودگی ریزنمونه‌های برگ بیشتر از درصد آلودگی ریزنمونه‌های دمبرگ بود.

در پژوهش حاضر می‌توان آلودگی ریزنمونه‌ها را بیشتر به محیط رشد یافته‌ی پایه‌ی مادری خصوصا در رابطه با ریزنمونه بذر ارتباط داد. بذر افرای قرمز به‌علت داشتن پوسته بیرونی الیافی و پوسته چوبی داخلی شرایط ویژه‌ای را جهت حضور میکرو ارگانیسم‌ها فراهم می‌کند و از آن‌جایی‌که شرایط آب و هوایی از عوامل تاثیرگذار در آلودگی ریزنمونه‌ها است و پایه مادری افرای قرمز مورد استفاده، در محیطی با رطوبت بالای شمال کشور و در کنار گونه‌های متنوع گلخانه‌ای رشد یافت، حاوی میکروارگانیسم‌های بسیار متنوع بود. محققان دیگری نیز گزارش داده‌اند که تهیه ریزنمونه از گیاهانی که در آب و هوای مرطوب گرمسیری رشد می‌کنند بسیار مشکل‌تر از محیط‌های سردتر و خشک‌تر است (Ebrahimi *et al*., 2018).

از طرفی، برای ریزنمونه‌هایی مانند برگ، بهتر این است که در اوایل فصل رویش که برگ‌ها، جوان و شاداب هستند و کمتر در معرض آلودگی‌های محیطی بوده‌اند، مورد استفاده قرار گیرند زیرا درگذر زمان با اسپور قارچ‌ها و میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا در تماس هستند، لذا شدت آلودگی در آن‌ها بیشتر می‌گردد و جهت کنترل آلودگی آن‌ها از تیمارهای قوی‌تری استفاده می‌گردد (Mohamadzadeh Moghadam & Hamidi, 2017).

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]



شکل ۴- درصد آلودگی کشت‌ها براساس نوع ریزنمونه
Figure 4. The contamination percentage of cultures based on the type of the explant

در مطالعه‌ی حاضر، ۱۳ تیمار ضد عفونی‌کننده با ترکیب‌های مختلف برای تعیین تیمار بهینه برای ضدعفونی ریزنمونه‌های افرای قرمز مورد آزمون قرار گرفتند. مقایسه میانگین اثر تیمارهای ضدعفونی مختلف مورد آزمون بر درصد آلودگی کشت‌ها در شکل پنج نشان می‌دهد که تیمارهای کد Aa، Bb، Kk و Hh با بیشترین میزان آلودگی، در کلاسه‌ی a قرار گرفتند. تیمار Gg در کلاسه b، تیمار Ee در کلاسه c، تیمارهای Mm، Dd، تیمارهای Cc و Ii در کلاسه e و تیمار Ff در کلاسه d قرار گرفتند (شکل ۵). بالاترین درصد آلودگی در تیمار کد Aa (تیپول (۲ دقیقه) + قارچ‌کش بنومیل (۴ گرم بر لیتر) ۲۵ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد، ۳۰ ثانیه + H_2O_2 10% به مدت ۱۵ دقیقه) با میانگین ۱۰۰ درصد و کمترین مقدار آلودگی در تیمار کد Ll (تیپول (۲ دقیقه) + قارچ‌کش بنومیل (۴ گرم بر لیتر) (۲۵ دقیقه) + الکل ۷۵ درصد، ۶۰ ثانیه + هیپوکلریت‌سدیم ۲۵ درصد (۱۵ دقیقه) + کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) با ۳۲ درصد اندازه‌گیری شد. ترکیب تیپول (۲ دقیقه) + قارچ کش بنومیل (۴ گرم بر لیتر) ۲۵ دقیقه) به‌طور مشترک در تمام تیمارها به‌کار گرفته شد و در ادامه از ذکر آن خودداری شده است.

با وجود این‌که حفظ شرایط ضد عفونی یک پیش‌نیاز قطعی تکثیر موفق در شرایط آزمایشگاهی است، باید دقت شود که تیمار ضدعفونی، علاوه‌بر از بین بردن آلودگی‌ها، سبب مرگ ریزنمونه نشود (Sen *et al*., 2013).

ترکیب الکل ۷۰ درصد ۳۰ ثانیه + آب اکسیژنه ۱۰ درصد به‌مدت (۱۵ دقیقه) در تیمار Aa، ترکیب قارچ‌کش، الکل ۷۵ درصد ۶۰ ثانیه + آب اکسیژنه ۱۰ درصد (۱۰ دقیقه) در تیمار Bb، کلریدجیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) + آب اکسیژنه ۱۰ درصد (۱۵ دقیقه) در تیمار Hh، ترکیب الکل ۷۵ درصد، ۳۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد (۱۵ دقیقه) + آب اکسیژنه ۱۰ درصد (۵ دقیقه) در تیمار Kk نشان می‌دهد که ترکیب‌های ضدعفونی‌کننده مناسبی برای گونه افرای قرمز نیستند.

محققان دریافته‌اند که در بافت‌های حساس و بدون لایه محافظ، مثل برگ یا ساقه، استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم یا کلسیم رقیق‌شده با آب مقطر به‌دنبال شست‌وشوی الکلی نمونه‌ها موثر است (Emam, 2018; Mohamadzadeh Moghadam & Hamidi, 2017). در این مطالعه ترکیب قارچ‌کش، آب اکسیژنه و یا ترکیب قارچ‌کش، هیپوکلریت‌سدیم در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف مورد بررسی، تاثیر چندانی در از بین بردن آلودگی‌های ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ نداشت. براساس گزارش سایر محققین، هیپوکلریت سدیم به‌عنوان یک ضد عفونی‌کننده عمومی توانایی کنترل محدود این آلودگی‌ها را دارد (Alam *et al*., 2010; Lin *et al*., 1997).

ترکیب الکل ۷۵ درصد، ۶۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد، (۱۵ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) در تیمار Ll با ۳/۷۵ درصد، ترکیب الکل ۷۵ درصد، ۶۰ ثانیه + کلرید جیوه، ۰/۰۵ (۵ دقیقه) در تیمار Cc با ۶۶ درصد و ترکیب الکل ۷۰ درصد ۶۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد، (۵ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) در تیمار Ii با ۶۷ درصد، کمترین میانگین درصد آلودگی را نسبت به سایر تیمارهای مورد بررسی نشان دادند (شکل ۶).

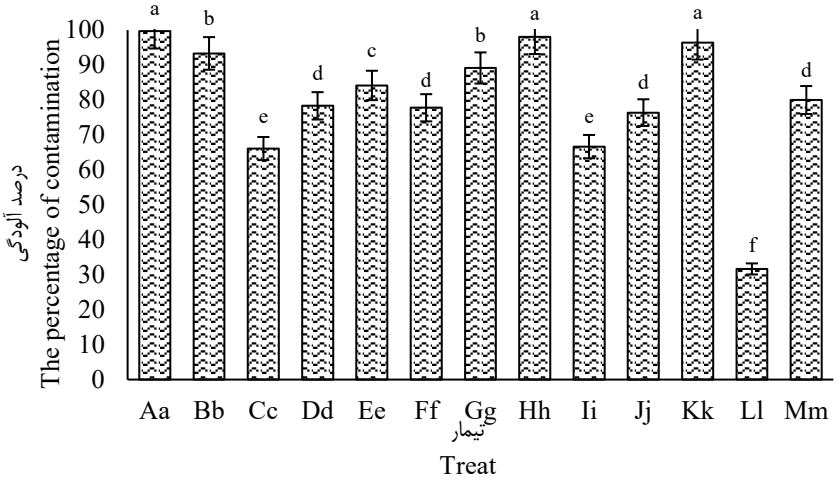
گزارش‌های زیادی قرار گرفتن در معرض $HgCl_2$ را باعث اثرات منفی بر میزان بقا و همچنین قرار گرفتن به‌مدت طولانی در معرض $HgCl_2$ را عامل قهوه‌ای شدن و مرگ ریزنمونه‌ها عنوان کردند (Johnson *et al*., 2011; Sen *et al*., 2013). اتانول یک عامل استریل‌کننده قوی و بسیار سمی برای گیاهان است (Gross, 1987)، زیرا موم‌های هیدروفوبیک و رزین‌ها را که محافظ میکروارگانیسم‌ها هستند حذف می‌کند و خود نیز در نقش یک ضدعفونی‌کننده در حذف آلودگی‌ها مؤثر است. برای بهبود اثربخشی تیمارهای مختلف ضدعفونی، از اتانول

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

قبل از استفاده از سایر ترکیبات استفاده می‌شود (Hesami *et al.*, 2018). به همین دلیل، در پژوهش حاضر نیز اتانول در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف مورد آزمون قرار گرفت.

گاهی روش‌های تلفیقی مانند کاربرد دو محلول ضدعفونی‌کننده به دنبال یکدیگر، برای حذف آلودگی‌ها کاربرد دارند (Gross, 1987). برای مثال، شاخه‌های بالغ *Pseudotsuga menziesii* با دو محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و کلریدجیوه ۰/۰۵ درصد در پی یکدیگر ضدعفونی شدند. مطابق با این بیان، با نگاهی به ترکیب مواد ضدعفونی‌کننده‌ی تیمارهای بهینه، مشاهده می‌شود که در پژوهش حاضر تنها استفاده همزمان از قارچ‌کش، الکل، هیپوکلریت سدیم و کلریدجیوه تاثیر بسیار مناسب‌تری بر حذف این آلودگی‌ها داشتند و آلودگی‌های سطحی گونه افرای قرمز بهتر کنترل شد. به‌طورکلی، ترکیب الکل و آب هیدروژنه و یا ترکیب الکل و هیپوکلریت سدیم به تنهایی اثر مطلوب را نداشت. کلرید جیوه به‌عنوان یک ضد عفونی‌کننده سطحی عمدتا همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود و کنترل طیف باکتری‌ها و قارچ‌ها و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد. محققین دیگر نیز اعلام کردند که ضد عفونی با کلریدسدیم تأثیری بر از بین بردن آلودگی نداشت (Ghaffar Shahriari *et al.*, 2011).

بنومیل از گروه قارچ‌کش‌های بنزیمیدازول، یک قارچ‌کش سیستمیک است که برای طیف وسیعی از میکروارگانسیم‌ها و بیماری‌های قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dane & Dalgiç, 2005). محمدزاده و همکاران (Mhammadzadeh *et al.*, 2019) گزارش دادند که استفاده از قارچ‌کش به‌همراه کلرید جیوه آلودگی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد.



شکل ۵- میانگین درصد آلودگی کشت‌ها براساس نوع تیمار ضد عفونی
Figure 5. The contamination percentage of cultures based on the type of sterilization treatment

پژوهشگران در بخش بیوتکنولوژی گیاهی مؤسسه ملی بیوتکنولوژی داکا بنگلادش، برای ارزیابی اثر ضدعفونی کننده‌های مختلف بر روی ریزنمونه‌های بذر *Achyranthes aspera L.* در شرایط آزمایشگاهی، در بین تیمارهای مختلف، محلول هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۳۰ دقیقه را موثرترین تیمار اعلام کردند. هرچند در غلظت‌های بالاتر، همه عوامل ضدعفونی‌کننده حداکثر اثر را در برابر آلودگی میکروبیولوژیکی نشان دادند، اما درصد بقا ریزنمونه‌ها کم بود (Naik & Karihaloo, 2007; Sen *et al.*, 2013).

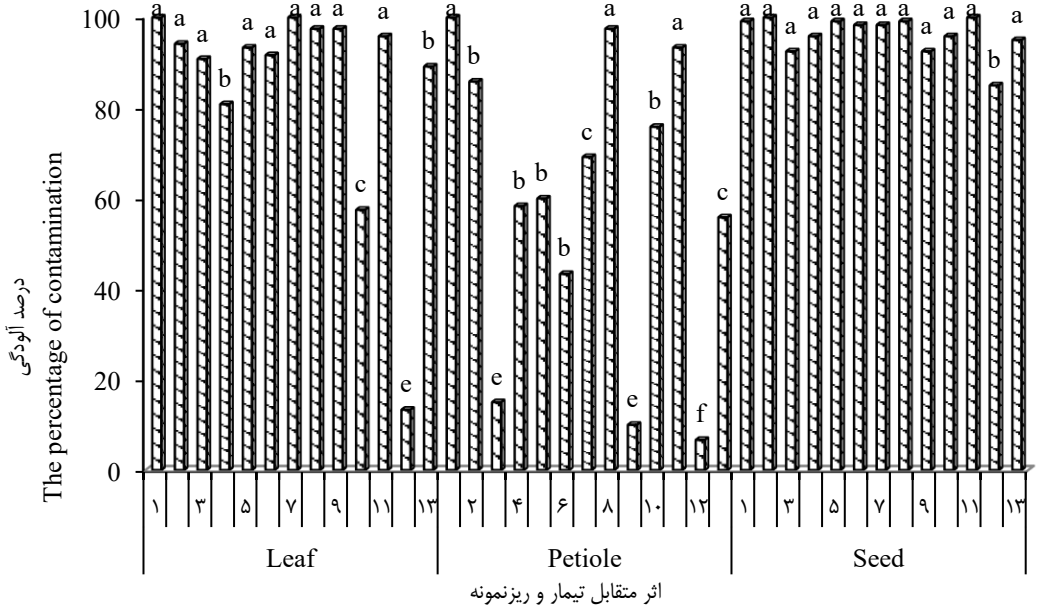
همان طور که نمودار مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع ریزنمونه و تیمار (شکل ۶) نشان می‌دهد، ریزنمونه بذر در تمام تیمارها درصد آلودگی بالاتری را نشان می‌دهد ولی برخی تیمارها اثر بیشتری در کنترل آلودگی ریزنمونه برگ و دمبرگ داشتند.

عدم دریافت نتیجه مطلوب در کنترل آلورگی ریزنمونه بذر در پژوهش حاضر را علاوه بر احتمال خطای انسانی و عدم کنترل آلودگی محیط، می‌توان به آلودگی‌های درونی بذر افرای قرمز کشت‌شده نیز نسبت داد، زیرا تا سه روز پس از کشت ریزنمونه در محیط کشت هیچ علامتی از آلودگی مشاهده نشد و اولین علائم آن پس از گذشت یک هفته از کشت در اکثر ظروف پدیدار شدند. همچنین، کشت بذر با پوسته‌ی چوبی داخلی روش مناسبی نیست و جهت دریافت نتایج بهتر است از روش کشت جنین بهره برد تا همانند سایر محققان از کمترین مواد ضدعفونی‌کننده استفاده گردد. در تولید گیاهچه‌های سرخدار (*Taxus baccata* L.) از طریق کشت جنین در شرایط درون شیشه‌ای، استفاده از تیمار آب اکسیژنه ۱۰ درصد به‌مدت ۱۵دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، مناسب‌ترین تیمار برای ضدعفونی بذور سرخدار در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌طوری که هیچ‌گونه آلودگی در آن مشاهده نشود گزارش شد (Razavi *et al.*, 2016).

به‌طور عمومی، انتظار می‌رود افزایش زمان تماس ریزنمونه با کلریدجیوه باعث کاهش آلودگی شود، حال آنکه پلی‌فنلی شدن بافت‌ها موجب نابودی کشت‌ها می‌گردد که این مورد در نتایج آزمایش ما نیز بر روی ریزنمونه برگ مشهود بود و علائم قهوه‌ای شدن قابل تشخیص بود. از این‌رو، برای تعیین درصد مناسب کلریدجیوه مورد استفاده بر اساس حساسیت گونه مورد

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

بررسی باید چندین تست اولیه، قبل از کشت‌های اصلی، انجام شوند تا در صورتی که کشت‌ها بر اثر اعمال غلظتی خاص از کلریدجیوه از بین روند یا علائم فنلی‌شدن بروز نماید استفاده از غلظت‌های کمتر و زمان‌های کوتاه‌تر می‌تواند راه‌حلی برای حفظ ریزنمونه همزمان با کاهش آلودگی باشد. در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که کلرید جیوه ۰/۰۱ درصد در تیمار ۵ دقیقه عملکرد بهتری را نسبت به تیمار ۱۰ دقیقه در تیمار Ll بر روی هر سه ریزنمونه داشت (شکل ۶). گزارش‌هایی در مورد تأثیر کلریدجیوه در غلظت بالا بر مرگ ریزنمونه‌ها وجود دارند. در پژوهشی (Mohammadzadeh *et al*., 2019) گزارش شد که در تیمار ضدعفونی A با (زمان استفاده از کلرید جیوه ۳ دقیقه) تعداد شاخه جانبی، طول ساقه و تعداد برگ بیشتری نسبت به تیمار ضدعفونی B (زمان استفاده از کلرید جیوه ۵ دقیقه) مشاهده شد. همچنین، سون و همکاران (Son *et al*., 2011) اعلام کردند که ریزنمونه‌های آلوسترومریا که در غلظت ۰/۰۱ درصد کلرید جیوه، ضدعفونی شده بودند، شاخه‌هایی تولید کردند که از لحاظ ظاهری ضعیف‌تر بودند و به سختی ریشه تولید می‌کردند. در تحقیقی، تیمار هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه برای حداکثر بقای ریزنمونه برگ ژربرا توصیه شد (Kumar *et al*., 2021) که با نتایج پژوهش حاضر و تحقیقات (Majid *et al*., 2014) و (Nasiri, 2008) نیز مطابقت دارد. در پژوهش حاضر، تیمارهای ضدعفونی متشکل از آب اکسیژنه و هیپوکلرید سدیم بدون اعمال کلرید جیوه از جمله تیمارهای Aa و Bb تاثیری در کنترل آلودگی نشان ندادند. از سوی دیگر، در پژوهشی جهت نیل به ریزنمونه استریل بذور *Ficus religiosa* در شرایط درون‌شیشه‌ای، با تیمار اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به‌مدت ۵ دقیقه نتایج مطلوبی به‌دست آمد (Hesami *et al*., 2018). در مطالعه‌ای با عنوان تنوع سوماکلونال در گیاهک‌های باززایی‌شده ازاندام‌های ساقه، ریشه و لپه لیلکی ایرانی (*Gleditschia capsica* Desf) از پروتکل ضد عفونی به‌صورت غوطه‌وری در کلرید جیوه ($HgCl_2$) نیم درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه، آب‌کشی با آب مقطر استریل و غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت سه بار آب‌کشی با آب مقطر استریل استفاده شد و ریزنمونه سالم به‌دست آمد (Imani Rastabi *et al*., 2022).



شکل ۶- کشت‌ها براساس اثر متقابل نوع ریزنمونه و تیمار ضدعفونی بر میانگین درصد آلودگی کشت‌ها
Figure 6. Cultures based on the interaction effect of the explant type and disinfection treatment on the average contamination percentage of cultures

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]
[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

شکل ۷- تصویر ظروف مربوط به بهترین تیمار (Ll) و عدم آلودگی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ۷ روز پس از کشت
Figure 7. The containers related to the superior treatment (Ll) and the absence of contaminated leaf and petiole explants 7 days after culture

تشخیص آلودگی‌های قارچی و باکتریایی

در مطاله حاضر، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی به‌روش مورفولوژیکی و با چشم غیر مسلح توسط متخصصین بخش گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان تشخیص داده شدند. عوامل بیماری قارچی عمدتاً سفید، کرم تا سیاه رنگ بودند که طبق تشخیص انجام گرفته از جنس‌های *Penicillium* sp.، *Aspergillus* sp.، *Cryptococcus* sp.، *Mucur* sp.، *Rhizopus* sp.، *Fusarium* sp. و *Pythium* sp. بودند (شکل ۸).

شکل ۸- تصویری از آلودگی قارچ‌های شناسایی شده
Figure 8. An image of the infection form of the identified fungi

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]

[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی تیمار مناسب جهت ضدعفونی‌کردن ریزنمونه‌های بذر، برگ و دمبرگ گونه‌ی افرای‌قرمز، تیپول (دو دقیقه) + قارچ‌کش بنومیل (۴ گرم بر لیتر) (۲۵ دقیقه) + الکل ۷۵ درصد، ۶۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد (۱۵ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۵ دقیقه) بود و در ریزنمونه‌های دمبرگ آلودگی کمتری نسبت به برگ پدیدار گشت.

در کشت بافت گونه‌های وارداتی و تزئینی مانند افرای قرمز که هدف تکثیر تجاری گیاه باشد، کنتـرل آلودگی‌ها و تهیه ریزنمونه اسـتریل اهمیتی دوچندان می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده به‌صورت ترکیبی از قارچ‌کش، الکل، کلرید جیوه و هیپوکلریت سدیم در این گونه تاثیر بیشتری در کاهش آلودگی دارد و مطابق با نتایج اعمال سایر تیمارها، کاربرد هر یک از این مواد به‌تنهایی یا فقط یک مرحله ضدعفونی با ماده‌ای دیگر این تاثیر را ندارد. به‌طور کلی، استفاده از این مواد یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی در کشت درون‌شیشه‌ای است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله‌ی حاضر از زحمات جناب آقای دکتر علیرضا صابری، ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان و جناب آقای مهندس لطف ا... پارسایی، معاونت محترم امور مالی و پشتیبانی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان جهت فراهم‌سازی شرایط انجام آزمایشات، و جناب آقای دکتر حجت‌الله ربانی نسب، هیئت علمی بخش گیاه‌پزشکی که در تشخیص نوع آلودگی‌ها یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

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.

Borhani, A., & Mousazadeh, S. (2008). Life cycle and importance of maple tar spot on Acer spp. in Mazandaran Province. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 6*(2), 88-97.

Dai, C.-w., Yan, Y.-y., Liu, Y.-m., Liu, Y.-m., Deng, Y.-w., & Yao, H.-y. (2020). The regeneration of Acer rubrum L."October Glory" through embryonic callus. *BMC Plant Biology, 20*, 1-11.

Dane, F., & Dalgiç, Ö. (2005). The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (Allium cepa L.) root apical meristem. *Acta Biologica Hungarica, 56*, 119-128.

Ebrahimi, S., Zaker Tavallaie, F., Zarea Mehrjerdi, M., & Ghorban-zadeh, M. (2018). Optimization of Direct Regeneration of Astragalus verus in in vitro condition. *Agricultural Biotechnology Journal, 10*(3), 17-30.

Emam, M. (2018). Key solutions for the problems of forest trees micropropagation. *Iran Nature, 3*(1), 40-47.

Emoghene, B., Idu, M., Eke, C., & Asemota, O. (2020). Effects of different sterilization regimes & growth regulators on micropropagation of female date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Nigerian Journal of Biotechnology, 37*(1), 159-168.

Fadhaladeen, L. H., Toma, R. S., Mohammed, M. A., Shaheen, A. A., & Ahmed, H. B. (2021). Response of Red Maple (Acer rubrum L.) Micropropagation to Different In Vitro Conditions. *Journal of Plant Production, 12*(6), 651-655.

Ghaffar Shahriari, A., Bagheri, A., Sharifi, A., & Moshtaghi, N. (2011). In vitro Contamination Controlling of the Rhizome Explants of Alstroemeria Plant. *Journal of Horticultural Science, 25*(1), 109-115. https://doi.org/10.22067/jhorts4.v1390i1.9756 [In Persian]

Ghasemi Aghbash, F., Aghaei, A., & Ghanbari, D. (2023). Study of Nutrient Uptake Status of Tree Species in a number of parks in Tehran [Research]. *Ecology of Iranian Forests, 11*(21), 40-53. http://ifej.sanru.ac.ir/article-1-471-en.html [In Persian]

Gross, M. A. (1987). Assessment of the effects of household chemicals upon individual septic tank performances.

Hashim, S. N., Ghazali, S. Z., Sidik, N. J., Chia-Chay, T., & Saleh, A. (2021). Surface sterilization method for reducing contamination of Clinacanthus nutans nodal explants intended for in-vitro culture. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 306, p. 01004). EDP Sciences.

Hathaway, N. A., Love, S. L., & Tripepi, R. R. (2020). Micropropagation methodology for Douglas Maple (Acer glabrum var. douglasii). *Native Plants Journal, 21*(3), 359-364.

Hesami, M., Daneshvar, M. H., & Yoosefzadeh-Najafabadi, M. (2018). Establishment of a protocol for in vitro seed germination and callus formation of *Ficus religiosa* L., an important medicinal plant. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 13*(4), e62682.

Imani Rastabi, M., Hosseini Nasr, S., Ranjbar, G., & Khoshhal Sarmast, M. (2022). Somaclonal diversity in regenerated plants from stem, root and cotyledons of Caspian locust (*Gleditschia capsica* Desf.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 29*(2), 268-281.

Imani Rastabi, M., Hosseini Nasr., S. M., Ranjbar, G. A., & Khoshhal Sarmast, M. (2022). In Vitro Callus Induction and Regeneration of *Gleditsia caspica* Desf. in Iranian glass conditions. *Ecology of Iranian Forest*, 9(18), 43-53. doi:10.52547/ifej.9.18.43 [In Persian]

Johnson, M., Wesely, E., Kavitha, M., & Uma, V. (2011). Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of Mentha arvensis L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4*(3), 196-200.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]

[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]

Khodaei, A., Rahnama, K., & Serailoo, M. (2009). Effects of water potential and pH on growth of Fusarium species. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 16*(2), 330-332.

Kumar, M., Prasad, Y., Yadav, A., & Kumar, A. (2021). Effects of two different surface sterilization (Sodium Hypochlorite and Mercuric Chloride) agents under in-vitro leaf explant in Gerbera (Gerbera jamesonii Bolus). *Journal of Pharmaceutical Innovation*, *10*, 1346-1349.

Li, H., Zhang, J., Yang, Y., Jia, N., Wang, C., & Sun, H. (2017). miR171 and its target gene SCL6 contribute to embryogenic callus induction and torpedo-shaped embryo formation during somatic embryogenesis in two lily species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC),* 130, 591-600.

Lin, H., De Jeu, M., & Jacobsen, E. (1997). Direct shoot regeneration from excised leaf explants of in vitro grown seedlings of Alstroemeria L. *Plant Cell Reports,* 16, 770-774.

Majid, B., Roopa, G., Sampath, K., Kini, R., Prakash, H., Abbagani, S., Mehdi, K., & Geetha, N. (2014). Establishment of an efficient explant surface sterilization protocol for in vitro micropropagation of Salacia chinensis L., an endangered anti-diabetic medicinal plant. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3*(12), 1266-1274.

Mohamadzadeh Moghadam, N., & Hamidi, H. (2017). Study on the effects of medium, sterilization and hormonal treatment on micropropagation of some apple (Mallus domestica Borkh.) rootstocks. *Plant Productions, 40*(1), 41-54.

Mohammadzadeh, A., Payamnoor, V., & Kavosi, M. (2019). Evaluation type of explants and season of sampling under different disinfection treatments for the tissu culture of Buxus hyrcana Pojark. *Forest Research and Development, 5*(4), 527-540.

Naik, P., & Karihaloo, J. (2007). Micropropagation for Production of Quality. *The help of Dr. KC Thakhur, Mrs. Tarvinder Kochhar and Mr. Dharminder*.

Nasiri, M. (2008). Investigation of suitable seed germination enhancement and breaking seed dormancy treatment of Montpellier maple (Acer monospessulanum L.). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16*(1), 94-105.

Pant, M., & Husen, A. (2022). Micropropagation in mature trees by manipulation of phase change, stress, and culture environment. In *Environmental, Physiological and Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings* (pp. 421-437). Academic Press.

Razavi, S., Hosseini Nasr, S., Rostami, C. F., & Rezadoost, H. (2016). Production of Common yew (*Taxus baccata* L.) Seedlings by Embryo Culture Under in vitro Conditions. *Journal of Wood and Forest Science and Technology,* 23(1), 115-131.

Read, P., & Preece, J. (2014). Cloning: plants–micropropagation/tissue culture. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems,* 317-336.

Rostami, H., Nasr, S., Kazemitabar, S. K., & Zafarian, F. (2019). Effect of provenances and culture media on seed germination of ash (Fraxinus excelsior L.) in embryo in vitro culture. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 27*(2), 159-168. [In Persian]

Sen, M., Hassan, M. M., Shamima, N., Jamal, M., Mamun-Or-Rashid, A., & Dash, B. (2013). In vitro sterilization protocol for micropropagation of Achyranthes aspera L. node. *International Research Journal of Biotechnology, 4*(5), 89-93.

Sen, M. K., Jamal, M., & Nasrin, S. (2013). Sterilization factors affect seed germination and proliferation of Achyranthes aspera cultured in vitro. *Environmental and Experimental Biology, 11*, 119-123.

Son, N., Mokashi, A., Hegde, R., Patil, V., & Lingaraju, S. (2011). Response of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) varieties to micropropagation. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 24*(3), 354-357.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-06-21]

[DOI: 10.61882/ifej.2025.528]