Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Ecology of Iranian Forests, Vol. 11, Issue 2, 2023 p: 13-23

OPEN ACCESS

Research Paper

The Effect of Some Disinfectants on the Contamination Control of Box Tree Explants under in *Vitro* Culture

Akram Ahmadi[1], Maryam Moslehi Jouybari[2], Saeid Shabani[3], Sepideh Zavvar[4], Mohammad Karim Maghsudloo[5] and Hojjatollah Rabbani Nasab[6]

1- Research Assistant, Research Department of Natural Resources, Golestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran, (Corresponding author: Ahmadi.1870@gmail.com)
2- Research Assistant, Research Department of Natural Resources, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Bandar Abbas, Iran
3- Research Assistant, Research Department of Natural Resources, Golestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran
4, 5- Research Expert, Research Department of Natural Resources, Golestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran
6- Research Associate, Plant Protection Research Department, Golestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran

Received: 24 December, 2022 Accepted: 6 May, 2023

Extended Abstract

Background: Hyrcanian boxwood (Buxus hyrcana Pojark.) is an evergreen tree native to the Hyrcanian forests in northern Iran. This species is considered one of the endangered plant species due to habitat loss, overexploitation, and environmental changes. In vitro propagation of this valuable species offers a viable solution to prevent its extinction and promote conservation efforts. However, one of the significant challenges faced in the in vitro culture of Buxus hyrcana is the presence of fungal and bacterial contamination. Such contamination not only affects the successful propagation of this species but also leads to increased costs and resource wastage. The objective of the present study is to investigate the efficacy of various disinfectants, including 15% Percidine, Aqua Percidine, Super Percidine, and Percidine Plus, in removing contamination from B. hyrcana explants under in vitro culture conditions. These treatments were compared to the conventional method of using sodium hypochlorite, which is commonly employed for sterilization in plant tissue culture. By evaluating the effectiveness of these disinfectants, we aim to identify a reliable method for reducing contamination and improving the success rates of in vitro propagation for Hyrcanian boxwood.

Methods: The experiment was conducted using a factorial arrangement as a completely randomized design, with three replications to ensure statistical validity. Initially, explants, which included both twigs and seeds, were thoroughly washed with ordinary water combined with a few drops of dishwashing liquid for five minutes. This step was crucial to eliminate any surface contaminants that could interfere with subsequent sterilization processes. Following this, the explants were treated with a 1% benomyl fungicide for ten minutes to further reduce fungal presence. After the pre-treatment, the sterilization of explants was carried out under laminar airflow conditions using the experimental disinfectant treatments. The treatments included varying concentrations of Percidine (15%), Aqua Percidine, Super Percidine, and Percidine Plus at concentrations of 0%, 1%, 2%, and 4%. These treatments were compared against the standard sodium hypochlorite method, which served as the control. Once the sterilization process was complete, the plant materials were placed on Murashige and Skoog (MS) medium, a widely used nutrient medium for plant tissue culture that provides essential nutrients for growth. To assess contamination levels, the cultures were monitored under controlled growth conditions at a temperature of 25±1 °C, with a light intensity ranging from 1000 to 1500 lux, following a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness. This

Copyright ©2023 Ahmadi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 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.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]

[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

setup ensured optimal growth conditions for the explants while allowing for accurate evaluation of contamination rates.

Results: The results of the study indicated a significant difference in fungal and bacterial contamination levels between the seed and twig explants. Specifically, contamination in the seed explants was considerably reduced compared to the twig explants. This finding suggests that the type of explant used plays a critical role in the success of sterilization protocols. Among the disinfectants tested, Super Percidine demonstrated the highest efficiency, achieving a contamination reduction rate of 63% in twig explants. This result highlights the potential of Super Percidine as an effective sterilizing agent for this particular type of explant. In addition to Super Percidine, Aqua Percidine also showed promising results in seed explants, with a contamination reduction rate of 33%. This indicates that both disinfectants can effectively reduce contamination on the surface of seeds, making them suitable choices for in vitro propagation efforts. The comparative analysis of the various treatments revealed that while sodium hypochlorite is commonly used, the alternative disinfectants tested in this study may offer improved outcomes, particularly for specific explant types.

Conclusion: In conclusion, the findings of this research suggest that the use of Super Percidine at a concentration of 2% is particularly beneficial for sterilizing twig explants of Hyrcanian boxwood. Furthermore, both Super Percidine (2%) and Aqua Percidine (2%) are recommended for use with seed explants, as they effectively reduce contamination rates and enhance the likelihood of successful in vitro propagation. These results contribute valuable insights into the optimization of sterilization protocols for endangered plant species, ultimately aiding in conservation efforts and the sustainable management of Hyrcanian boxwood populations.Future studies should explore the long-term effects of these sterilization methods on the growth and development of Buxus hyrcana in vitro, as well as the potential for scaling up these techniques for broader conservation applications. By improving our understanding of effective propagation methods, we can better support the preservation of this important species and its habitat.

Keywords: *Buxus hyrcana*, Sterilization, Plant tissue culture, Super Percidine, Aqua presidine

How to Cite This Article: Ahmadi, A., Moslehi Jouybari, M., Shabani, S., Zavvar, S., Maghsudloo, M. K., & Rabbani Nasab, H. (2023). The Effect of Some Disinfectants on the Contamination Control of Box Tree Explants under in Vitro Culture. *Ecol Iran For*, 11(2), 13-23. https://doi.org/10.61186/ifej.11.22.12

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

اثر برخی ضدعفونی کننده‌ها بر کنترل آلودگی ریزنمونه‌های شمشاد هیرکانی در شرایط درون شیشه‌ای

اکرم احمدی[۱]، مریم مصلحی جویباری[۲]، سعید شعبانی[۳]، سپیده زوار[۴]، محمدکریم مقصودلو[۵] و حجت الله ربانی نسب[۶]

۱- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران، (نویسنده مسوول: Ahmadi.1870@gmail.com)

۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۴ و ۵- کارشناس پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۶- دانشیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۱۶

صفحه: ۱۳ تا ۲۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: شمشاد هیرکانی با نام علمی *Buxus hyrcana* Pojark درختی همیشه‌سبز و بومی جنگل‌های هیرکانی در شمال ایران است که از جمله گونه‌های گیاهی در خطر انقراض محسوب می‌شود. تکثیر درون شیشه‌ای این گونه با ارزش می‌تواند از انقراض آن جلوگیری کند. وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مشکلات اساسی کشت درون شیشه‌ای شمشاد است که می‌تواند تکثیر این گونه را تحت تاثیر قرار دهد و از طرفی هزینه‌های بسیاری را در پی داشته باشد. در پژوهش حاضر کارایی ضدعفونی‌کننده‌های پرسیدین ۱۵ درصد، پرسیدین آکوا، سوپر پرسیدین و پرسیدین پلاس در حذف آلودگی ریزنمونه‌های شمشاد هیرکانی در شرایط کشت درون شیشه‌ای در مقایسه با ماده ضدعفونی کننده معمول (هیپوکلریت سدیم) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. ابتدا به‌منظور اعمال پیش تیمار، ریزنمونه‌ها (سرشاخه و بذر) با آب معمولی و چند قطره مایع ظرفشویی به‌مدت پنج دقیقه جهت حذف آلودگی‌های سطحی مورد شستشوی اولیه قرار گرفتند. سپس، به‌مدت ۱۰ دقیقه در قارچ‌کش بنومیل (۱٪) قرار داده شدند. بعد از آبشویی، در زیر هود استریل، ضدعفونی ریزنمونه‌ها با تیمارهای آزمایشی انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل ماده ضدعفونی کننده (پرسیدین ۱۵٪، پرسیدین آکوا، سوپر پرسیدین، پرسیدین پلاس (در غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) در مقایسه با هیپوکلریت سدیم بودند. بعد از ضدعفونی ریزنمونه‌ها، مواد گیاهی بر روی محیط کشت موراشی و اسکوگ قرارگرفتند. برای اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در شرایط رشدی با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در ریزنمونه بذر به‌طور معنی‌داری در مقایسه با ریزنمونه سرشاخه کاهش یافت. از طرفی در ریز نمونه سرشاخه، ماده استریل کننده سوپرپرسیدین کارایی بالایی (۶۳ درصد) را در کاهش آلودگی از محیط کشت نشان داد و در ریز نمونه بذر بعد از سوپرپرسیدین، ماده استریل کننده آکوا پرسیدین کارایی مناسبی را در کاهش آلودگی از سطح بذور داشت (۳۳ درصد).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد برای ریزنمونه سرشاخه استفاده از ماده استریل کننده سوپر پرسیدین (۲ درصد) و برای ریز نمونه بذر استفاده از سوپر پرسیدین (۲ درصد) و همچنین آکوا پرسیدین (۲ درصد) می‌تواند مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: آکوا پرسیدین، سوپر پرسیدین، شمشاد هیرکانی، ضدعفونی، کشت بافت گیاهی

مقدمه

شمشاد هیرکانی جزو گونه‌های بومی و طبیعی جنگل‌های هیرکانی به‌شمار می‌رود و به‌همین دلیل اهمیت حفاظتی بسیار زیاد برخوردار است. شمشاد خزری یا شمشاد هیرکانی گونه‌ای پهن‌برگ و همیشه سبز است که در جنگل‌های شمال رویش دارد. درختی سایه‌پسند است و تحمل آفتاب شدید را ندارد. رشد شمشادهای هیرکانی بسیار کند و به سالی یک میلی‌متر می‌رسد. از جمله ذخیره‌گاه‌های شمشاد می‌توان به نمک آبرود، سی‌سنگان، گرداب، خیبوس، جیسا و چشمه بلبل (بندرگز) و چند منطقه کوچک دیگر اشاره نمود. شمشاد هیرکانی در جامعه بلوط شمشادستان (*Querco Buxetum*) قرار دارد که با گونه‌های افرا، توسکا، لرگ، داغداغان، راش، لیلکی، خرمندی، شب خسب و غیره همراه است. از پوشش گیاهی کف هم می‌توان به گونه‌های علفی نظیر سرخس و گرامینه و تعدادی از گونه‌های خزه‌های خاکزی یا دارچسب اشاره کرد (Rajaei *et al*., 2013). گونه شمشاد کاربردهای دارویی و صنعتی بسیاری دارد (Rajaei *et al*., 2013).

قدمت حضور درختان شمشاد در جنگل‌های خزری به دوران سوم زمین شناسی برمی‌گردد و از این نظر به‌عنوان یکی از درختان بازمانده اقلیمی دوره پلیوسین در جنگل‌های شمال ایران محسوب می‌شود. در سالیان اخیر بیماری بلایت و همچنین آفت شب پره شمشاد خسارات بسیاری را به این گونه کمیاب و با ارزش وارد کرده است (Farahani *et al*., 2016). با توجه به مشکلاتی که گونه باارزش شمشاد با آن روبرو است، ریز ازدیادی یکی از راه‌های تکثیر این گونه جنگلی است. ریزازدیادی یکی از جنبه‌های تجاری استفاده از کشت درون شیشه‌ای است و مزایای زیادی نسبت به روش‌های متداول ازدیاد رویشی دارد (Ghasemi Bazdi and Ahmadi, 2008). برای ریزازدیادی موفق باید شرایط استریل برای کشت فراهم گردد. لذا، استفاده از مواد ضدعفونی کننده که آلودگی را به حداقل برساند جهت صرفه‌جویی در هزینه‌ها و به‌ویژه زمان بسیار مؤثر می‌باشد. از آنجایی‌که ضدعفونی در کشت بافت یکی از مراحل مهم و حیاتی است، در تمامی مطالعات کشت بافتی تیمارهای مختلفی از ضدعفونی به چشم می‌خورد. اما یافتن روشی مناسب که با کمترین آلودگی،

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]

[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

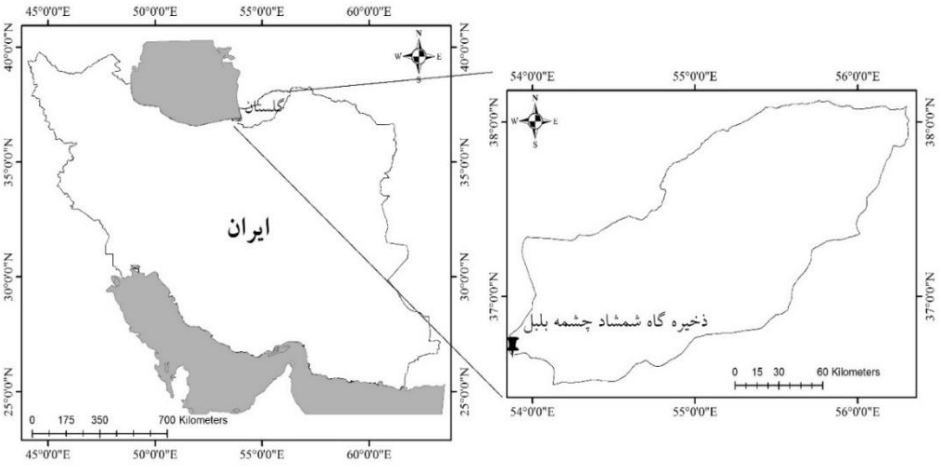
موفقیت کشت را بالا برد می‌تواند صرفه‌جویی قابل‌توجهی را در زمان و هزینه پروژه داشته باشد (Ghasemi Bezdi and Ahmadi, 2008). در خصوص ضدعفونی ریز نمونه‌های شمشاد مطالعات اندک است اما مطالعات انجام گرفته در خصوص ضدعفونی با انواع محصولات پرسیدین به شرح ذیل می‌باشد: میرعباسی لسکوکلایه و همکاران (Mir Abbasi Leskokelaye *et al*., 2012) در طی تحقیقی که مقایسه اثر سطوح مختلف هورمون توپولین بر روی پرآوری نارون ملج (*Ulmus glabra*) را انجام دادند، از ضدعفونی کننده پرسیدین در ضدعفونی جوانه‌های جانبی استفاده کردند.

میرعباسی لسکوکلایه و همکاران (Mir Abbasi Leskokelaye *et al*., 2013) تحقیق دیگری بر روی بهینه سازی کشت بافت ملج انجام دادند. ایشان از پرسیدین ۰/۱ در صد در ضدعفونی ریزنمونه جوانه‌های جانبی و انتهایی استفاده کردند که نتیجه تحقیقات ایشان نشان داد آلودگی به نه درصد کاهش یافت. نیک‌نژاد و همکاران (Niknejad *et al*., 2011) پژوهشی با عنوان ارزیابی درون شیشه‌ای ترکیبات با فعالیت ضدقارچی پراکسی استیک اسید (پرسیدین) بر روی یک گروه از قارچ‌ها انجام دادند. آن‌ها اثر غلظت‌های مختلف پراکسید استیک اسید (PAA) به‌عنوان پرسیدین و پرسیدین ۵۱۳ را بر روی میکروسپوروم گچ، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نیجر بررسی نمودند. سویه‌های استاندارد (PTCC) با ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد پرسیدین در ۳، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ دقیقه و ۰/۲ درصد پرسیدین ۵۱۳ در ۳، ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه تیمار شدند. بنابر گزارش ایشان، نتایج رضایت بخش با استفاده از یک و سه درصد پرسیدین برای *Candida albicans* و *Microsporum gypseum* پس از ۱۰ دقیقه به‌دست آمد و با به‌کارگیری پرسیدین پنج درصد، نتیجه پس از سه دقیقه به‌دست آمد. از طرف دیگر، در مورد *A. niger*، نتایج قابل قبولی پس از ۲۰ دقیقه برای پرسیدین سه درصد، ۱۰ دقیقه برای پرسیدین ۵ و ۱۰ درصد و در نهایت ۵ دقیقه برای پر سیدین ۲۰ در صد به‌دست آمد. طبق پروتکل ISIR ۶۹۸۶ موسسه استانداردها و تحقیقات صنعتی ایران، پراکسی استیک اسید (PAA) به‌دلیل قدرت بالای آن در کاهش شدت جمعیت میکروبی خصوصاً در مهم‌ترین گونه‌های قارچ، می‌تواند به‌عنوان یک ضدعفونی کننده قابل اطمینان برای استفاده در کاربردهای عمومی در نظر گرفته شود. استریلیزاسیون سطحی ریزنمونه‌ها، مرحله اساسی در کشت بافت گیاهی به‌شمار می‌رود، لذا در صورت برداشت ریزنمونه از محیط خارجی، احتمال آلودگی بالا و در نهایت در صورت عدم استریلیزاسیون موثر، احتمال مرگ و میر بافت گیاهی زیاد است (Singh, 2018).

اگرچه، تا به‌حال مطالعات زیادی در خصوص ضدعفونی ریزنمونه‌های گیاهی جنگلی صورت گرفته است اما، مطالعات اندکی در خصوص محصولات پرسیدین، سوپر پرسیدین و پرسیدین آکوا ساخت شرکت بهبان شیمی، ایران انجام گرفته است. با توجه به اهمیت ضدعفونی (از طریق حذف به‌کارگیری مواد مختلف ضدعفونی کننده در زمان‌های متفاوت) و به حداقل رساندن آلودگی، مطالعه حاضر با هدف بررسی کارایی پرسیدین، پرسیدین آکوا و سوپر پرسیدین (با تعیین غلظت بهینه) در حذف آلودگی از ریزنمونه‌های بذر و سرشاخه شمشاد هیرکانی در شرایط کشت بافت گیاهی انتقال یافت.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: نمونه‌برداری از عرصه جنگلی (ذخیره‌گاه شمشاد هیرکانی چشمه بلبل، بندرگز) انجام گرفت (شکل ۱). ذخیره‌گاه جنگلی شمشاد حدود ۴۲۰ هکتار وسعت دارد که در ۱۵ کیلومتری جنوب غربی بندرگز و ۱۰ کیلومتری جنوب شرقی گلوگاه در منطقه روستای چشمه بلبل و لیوان (طول جغرافیایی ´۵۳ °۵۳ تا ´۲۰ °۵۴ شرقی و عرض جغرافیایی ´۳۶ °۴۵ تا ´۳۶ °۴۷ شمالی) واقع شده است. نمونه‌ها پس از نمونه‌گیری، به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی انتقال یافت.



شکل ۱- محل نمونه‌برداری واقع در ذخیره‌گاه شمشاد چشمه بلبل، استان گلستان
Figure 1. Sampling site located in Cheshmeh Bolbol reserve, Golestan province

گونه‌های مطالعاتی: در این پژوهش گونه مورد مطالعه، شمشاد هیرکانی بود (شکل ۲).
مواد ضدعفونی مورد استفاده: تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول شماره یک آمده است.

تهیه مواد گیاهی: نمونه‌برداری به صورت سر شاخه و بذر از گونه شمشاد هیرکانی انجام گرفت (شکل ۳). نمونه‌برداری در اردیبهشت ماه و از سر شاخه‌های جوان انجام گرفت: برای تهیه ریزنمونه ابتدا بذرها از داخل کپسول جدا شده و

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

سرشاخه‌ها نیز به قطعات ۲-۳ سانتی‌متری برش داده شد.

روش تحقیق: سه پایه درختی به‌طور تصادفی انتخاب و نمونه‌گیری از این پایه‌ها انجام گرفت. ابتدا در آزمایشگاه به‌منظور پیش سترون‌سازی، ریزنمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در آب با چند قطره مایع ظرفشویی مورد شستشوی قرار گرفتند و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در قارچ‌کش بنومیل (۱٪) قرار گرفتند. بعد از آب شویی، در زیر هود ا ستریل، ضدعفونی ریزنمونه‌ها با تیمارهای آزمایشی در جهت کاهش آلودگی سطحی از ریزنمونه‌ها به‌صورت جدول (۱) در سه تکرار اعمال شد.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده در ضدعفونی سطحی از بذر و سرشاخه گونه شمشاد هیرکانی
Table 1. Treatments used in surface disinfection of seeds and twigs of *Buxus hyrcana* species

ردیف Row	تیمارهای ضدعفونی Disinfection treatments
1	استفاده از اتانول 96 درصد و هیپوکلریت سدیم (1، 2 و 4 درصد) و شستشو با آب مقطر سه بار به‌مدت 10 دقیقه (روش معمول) Using 96% ethanol and sodium hypochlorite (1, 2 and 4%) and washing with distilled water three times for 10 minutes (usual method)
2	استفاده از پرسیدین 15% (1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 5 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using 15% Percidine (1, 2 and 4%) for 5 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)
3	استفاده از پرسیدین 15% (1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 10 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using 15% Percidine (1, 2 and 4%) for 10 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)
4	استفاده از پرسیدین آکوا (1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 5 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using Percidine Aqua (1, 2 and 4%) for 5 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)
5	استفاده از پرسیدین آکوا (1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 10 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using Prasidine Aqua (1, 2 and 4%) for 10 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)
6	استفاده از سوپر پرسیدین (1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 5 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using Super Percidine (1, 2 and 4%) for 5 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)
7	استفاده از سوپر پرسیدین (1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 10 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using Super Percidine (1, 2 and 4%) for 10 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)
8	استفاده از پرسیدین پلاس (1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 10 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using Percidine Plus (1, 2 and 4%) for 10 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)
9	استفاده از پرسیدین پلاس(1، 2 و 4 درصد) به‌مدت 10 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using Percidine Plus (1, 2 and 4%) for 10 minutes and then, washing three times with distilled water (10 minutes)

بعد از ضدعفونی ریزنمونه‌ها، مواد گیاهی روی محیط کشت موراشی و اسکوگ قرارگرفتند. برای اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در شرایط رشدی با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بررسی آلودگی (آماربرداری) به‌صورت هفتگی انجام گرفت و تا یک ماه ادامه داشت. در پایان، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی مورد شناسایی قرار گرفت.

شکل ۲- درختان شمشاد در رویشگاه اصلی
Figure 2. *B. hyrcana* in origin site

شکل ۳- بذر، کپسول حاوی بذور و برگ شمشاد هیرکانی
Figure 3. Seed, Capsule containing seeds and leaves of *B. hyrcana*

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آزمایشات تحقیق به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی است. تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. باقی‌مانده‌های مدل، توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (برای نرمال بودن داده‌ها) بررسی گردید. همچنین به‌منظور انجام آنالیز چند متغیره، متغیرهای نوع ریزنمونه، ماده استریل‌کننده و غلظت استریل‌کننده مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

با توجه به میزان بالای آلودگی و عدم کنترل آن در تیمار زمانی پنج دقیقه و ایجاد اریبی در داده‌ها، تیمار زمان پنج دقیقه حذف و تنها داده‌های تیمار زمانی ۱۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج استفاده از ضدعفونی کننده‌ها در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌ها

در ابتدا بررسی نرمالیته داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بر روی باقی‌مانده‌های مدل انجام گرفت که نتایج حاکی از نرمال بودن داده‌ها بود ($p\geq ۰/۰۵$).

جدول شماره (۲)، نتایج آنالیز واریانس چند متغیره داده‌های حاصل از مواد استریل کننده پرسیدین ۱۵٪، سوپرپر سیدین، پرسیدین پلاس، آکواپلاس و هیپوکلریت سدیم را در غلظت‌های مختلف ۱، ۲ و ۴ درصد نشان می‌دهد. نتایج حاکی از معنی‌دار بودن پارامترهای نوع ریزنمونه، نوع استریل کننده و غلظت استریل کننده‌ها بود ($p\leq ۰/۰۱$)، همچنین، نتایج نشان داد که اثرات متقابل معنی‌داری بین نوع ریزنمونه × ماده ضدعفونی کننده، بین نوع ریزنمونه× غلظت ضدعفونی کننده ($p\leq ۰/۰۱$) وجود داشت ولی اثرات متقابل معنی‌داری در نوع ریزنمونه× ماده استریل کننده ×غلظت وجود نداشت ($p\geq ۰/۰۵$).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس کل داده‌ها در استریلزاسیون ریزنمونه‌ها قبل از کشت با پرسیدین ۱۵٪، سوپر پرسیدین، آکواپرسیدین و پرسیدین پلاس

Table 2. Results of ANOVA in sterilization of explants before culture with 15% Percidine, Super Percidine, Aqua Percidine and Percidine Plus

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean square	مقدار F F amount
ریزنمونه Explant	1	195.075	181.465**
ماده استریل کننده Sterilizing agent	4	196.179	182.462**
غلظت Density	3	355.575	330.674**
ریزنمونه×ماده ضدعفونی کننده Explant × Sterilizer	4	10.721	9.973**
ریزنمونه× غلظت ماده ضدعفونی کننده Explant × Concentration of Sterilizer	3	21.831	20.307**
ماده ضدعفونی کننده×غلظت ماده ضدعفونی کننده Disinfectant × Concentration of Sterilizer	12	25.524	23.743**
ریزنمونه× ماده ضدعفونی کننده×غلظت ماده ضدعفونی کننده Explant × Sterilizer × Concentration of Sterilizer	12	1.976	1.839**
خطا Error	80	1.075	
کل Total	120		

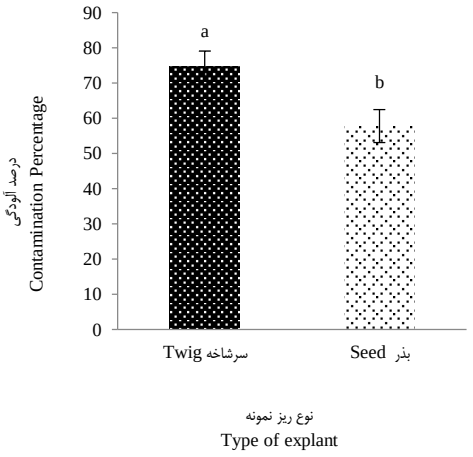
مقایسات میانگین داده‌ها نشان داد که میزان آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذر بود ($p\leq 0.01$) (شکل ۴). مقایسات میانگین داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ماده معمول در ضدعفونی کشت بافت (استفاده از هیپوکلریت سدیم) و استفاده از پرسیدین ۱۵٪ و پرسیدین پلاس وجود ندارد. از بین مواد مورد استفاده، سوپر پر سیدین نسبت به بقیه ضدعفونی کننده‌ها توانست آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌ها را به‌نحو موثر و معنی‌داری کاهش دهد (۶۳٪) (شکل ۵). لذا در ضدعفونی کننده‌های مختلف بدون توجه به نوع ریزنمونه، در صد آلودگی در هیپوکلریت سدیم، پر سیدین ۱۵٪، پرسیدین پلاس بیش از آکوا پرسیدین بیش از سوپر پرسیدین بود. همچنین، نتایج مقایسه میانگین غلظت‌های مورد بررسی نشان داد که غلظت‌های مورد استفاده اثرات معنی‌داری بر روی کاهش آلودگی داشتند به‌طوریکه کمترین آلودگی در سطح ۴ در صد و بیشترین آلودگی در تیمار شاهد مشاهده شد که با افزایش غلظت، میزان آلودگی کاهش یافت (شکل ۶). نتایج بررسی اثرات متقابل ریزنمونه و ماده استریل کننده نشان داد که موثرترین مواد در کاهش آلودگی سطحی از سطح ریزنمونه سرشاخه سوپرپر سیدین و در ریزنمونه بذر، آکواپرسیدین و سوپرپرسیدین می‌باشد (شکل ۷). نتایج مقایسات میانگین نشان داد که در بین تیمارهای مختلف، سوپرپرسیدین ۲ و ۴ درصد تفاوت معنی‌داری در کاهش آلودگی سطحی از ریزنمونه سرشاخه داشت (به‌ترتیب ۸۴/۵ و ۸۹/۹ درصد کاهش آلودگی) (شکل ۸). لازم به ذکر است که غلظت ۴ درصد باعث قهوه‌ای شدن (سوختگی و خشکیدگی) ریزنمونه‌ها شد (شکل ۹). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نوع ریزنمونه، ماده و غلظت استریل کننده اثرات معنی‌داری در میزان بروز آلودگی در محیط کشت دارند. به‌طوری‌که که آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذر بود. ریزنمونه گیاهی، مهم‌ترین منبع آلودگی در کشت بافت گیاهی است. لذا، قبل از کشت لازم است که ریزنمونه‌ها استریل شوند (Saeedi Heidari and Safarnejad, 2015).

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

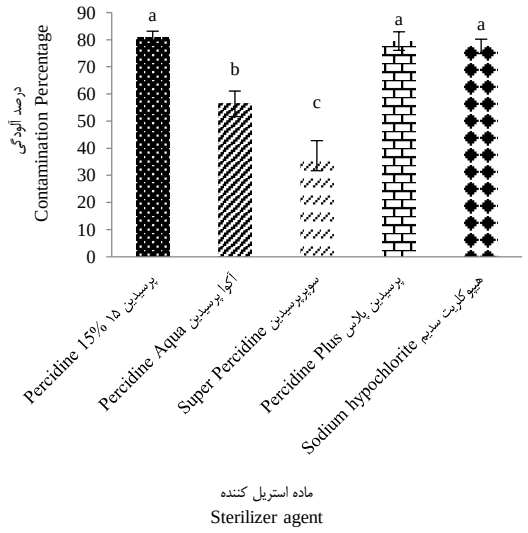
ریزنمونه های جمع‌آوری شـــده از بوم‌ســـازگان های طبیعی آلودگی‌های سطحی بسیاری دارند و کنترل آلودگی‌های آن از جمله مشـکلات بزرگ در کشـت بافت گیاهی اسـت (Dhar and Upreti, 1999).

لازم به ذکر اســـت که آلودگی در ریزنمونه‌ها به عوامل مختلفی از قبیل نوع گونه، نوع ریزنمونه، ســـن، فصـــل نمونه‌برداری و شرایط آب و هوایی بستگی دارد (Read and Preece, 2014). با توجه به نتایج حاصـــل از این پژوهش و میزان آلودگی بیشتر در ریزنمونه‌های سر شاخه در مقایسه با بذر می‌توان عنوان کرد که به‌دلیل مدت تماس بیشـــتر ریزنمونه‌ها در تماس با محیط بوده اســـت و از طرفی بافت ریزنمونه نیز در آلودگی موثر است (Mohamadzade *et al*., 2020).

طبق ISIR (پروتوکل ۶۹۸۶ موســـســـه اســـتانداردها و تحقیقات صـــنعتی ایران)، PAA[1] به‌دلیل قدرت بالای آن در کاهش شدت جمعیت میکروبی خصوصاً در مهمترین گونه‌های قارچ می‌تواند به‌عنوان یک ضـــدعفونی کننده قابل اطمینان برای اســـتفاده در کاربردهای عمومی در نظر گرفته شـــود (Niknejad *et al*., 2011). اگرچه در بســیاری از پژوهش‌ها استفاده از پرسیدین (پراکسی استیک اسید) حتی در درصدهای پایین نیز موثر بوده اسـت (Mir Abbasi Leskokelaye *et al*., 2012) ولی در گونه جنگلی شمشاد به‌دلیل آلودگی بسیار در بوم‌ســـازگان جنگلی این اســـتریل کننده کارایی چندانی نداشـت اما سـوپرپرسـیدین با داشـتن مواد موثره‌ای همچون پراکسـی اسـتیک اسـید، حاوی هیدروژن پراکسـاید و اسـید استیک گلاسیال (رفرنس) کارایی بالاتری در ضدعفونی ریز نمونه سـرشـاخه نشـان داد. از طرفی، در ریزنمونه سـرشـاخه، سوپرپرسیدین ۲٪ کارایی خوب و مناسبی را در کاهش آلودگی نشـان داد در صـورتی‌که سـوپر پرسـیدین ۴ درصـد علی‌رغم کاهش بیشـــتر آلودگی بدلیل ایجاد ســـوختگی و اثر بر روی زنده‌مانی ریزنمونه گزینه مناســـبی نبود که احتمالا به‌دلیل افزایش میزان ماده موثره اســـتریل‌کننده می‌باشـد. لذا غلظت مناسب برای ضدعفونی ریزنمونه سر شاخه در گونه شمشاد هیرکانی سوپرپرسیدین ۲٪ معرفی می‌گردد. اگرچه نیک‌نژاد و همکاران (Niknejad *et al*., 2011)، دوز ۱ و ۳ ٪ پر سیدین و پرســـیدین ۵۱۳ را به‌مدت ۱۰ دقیقه در کنترل گروهی از قارچ‌ها از جمله میکروسـپوروم گچ و کاندیدا آلبیکنس مناسـب تشخیص دادند ولی بر روی ماده سوپرپرسیدین گزارش مدون علمی یافت نشد.



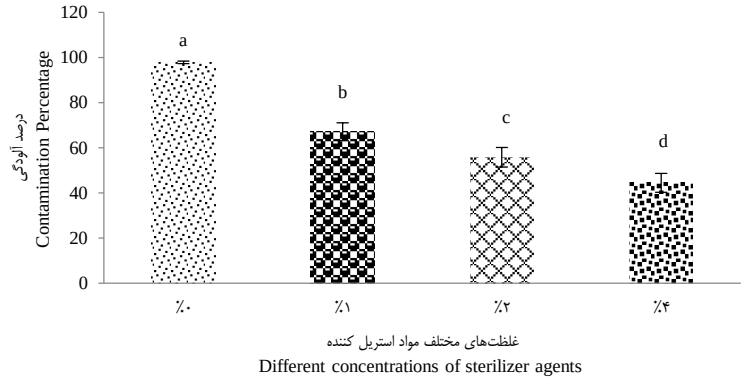
شکل ۴- مقایسه میانگین درصد آلودگی در دو ریزنمونه سرشاخه و بذر
Figure 4. Compare means of infection Percentage in twigs and seeds



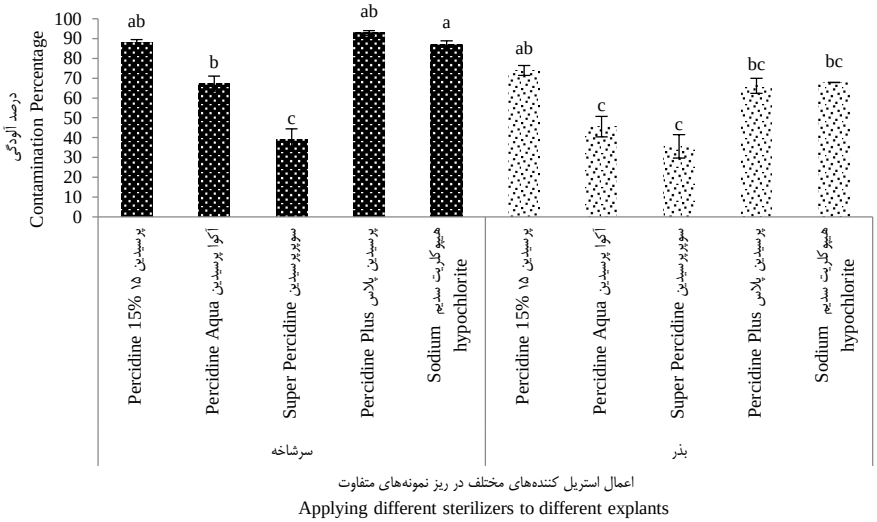
شکل ۵- مقایسه میانگین داده‌های استریل کننده‌های مختلف
Figre 5. Compare means of data of different sterilizers

1- Peracetic acid

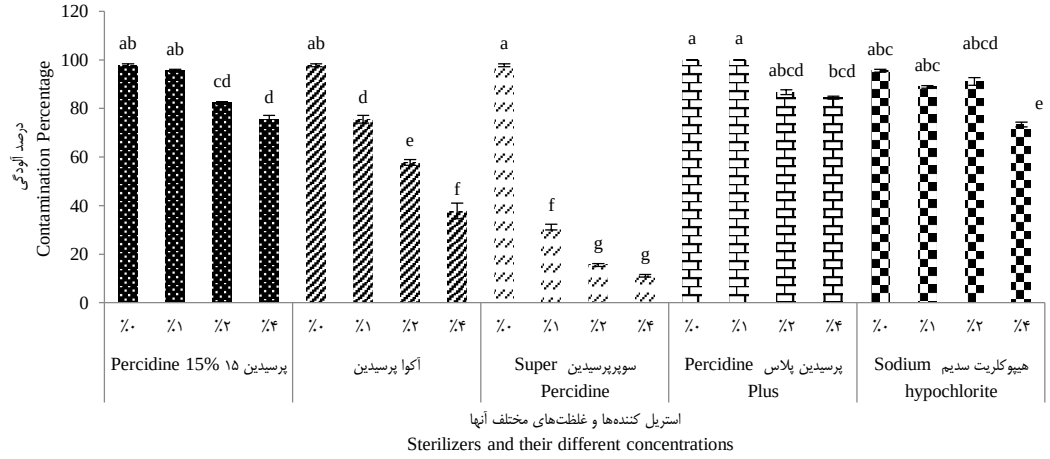
[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]



شکل ۶- مقایسه میانگین اثرات غلظت‌های مختلف مواد استریل کننده در کاهش آلودگی سطحی از ریزنمونه‌ها
Figure 6. Compare means of different concentrations of sterilizers in reducing surface contamination of explants



شکل ۷- مقایسه اثرات متقابل ریزنمونه و ماده استریل کننده
Figure 7. Comparison of interaction effect between explants and sterilizer



شکل ۸- مقایسه اثرات متقابل ماده استریل کننده در غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) در ریزنمونه سرشاخه
Figure 8. Comparison of interaction effect of sterilizer in different concentrations (0, 1, 2 and 4%) in twigs explants

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

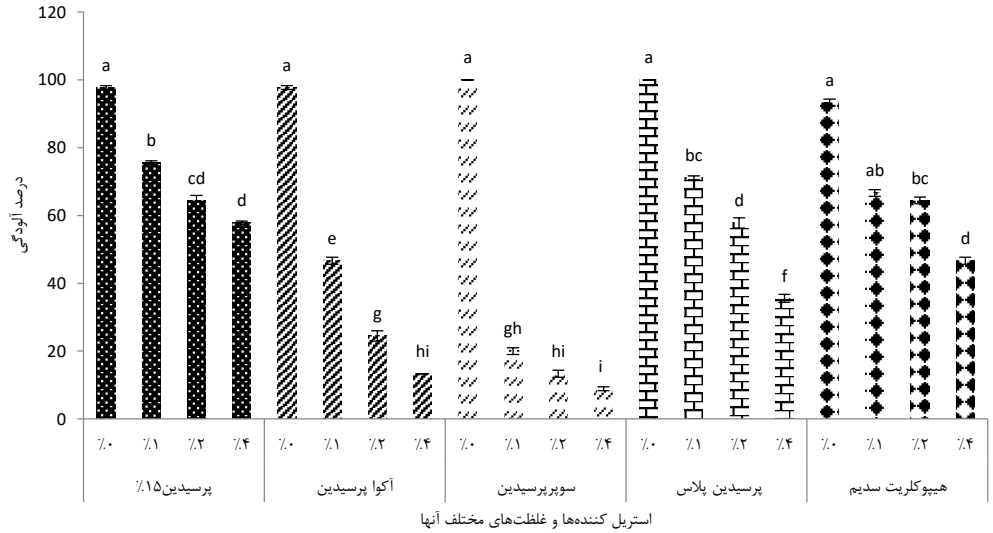
شکل ۹- سوختگی ریزنمونه سرشاخه در سوپرپرسیدین 4%
Figure 9. Twig explant burning in super Percidine 4%

مقایسه اثرات متقابل ماده استریل کننده و غلظت‌های مختلف آن‌ها در آلودگی سطحی ریز نمونه بذر

نتایج بررسی اثرات متقابل در ریزنمونه بذر نشان داد که در تیمار شاهد بیشترین میزان آلودگی مشاهده شد و کمترین آلودگی در غلظت‌های مختلف سوپر پرسیدین (۲ و ۴٪) (به‌ترتیب ۸۶/۷ و ۸۱/۲ در صد کاهش آلودگی سطحی) و اکوا پرسیدین (۴) (۸۶/۶۷ درصد کاهش آلودگی سطحی) اتفاق افتاد (شکل ۱۰). همانطور که قبلاً اشاره شد، مواد موثره در ماده استریل کننده سوپرپرسیدین شامل پراستیک اسید، هیدروژن پراکساید و اسید استیک گلاسیال است. پراستیک اسید با توجه به طیف وسیع فعالیت شیمیایی خود، توانایی از بین بردن کلیه اشکال میکروبی را دارد و مقاومت میکروبی ایجاد نمی‌کند. دانشمندان دلیل عدم ایجاد مقاومت میکروبی در مقابل پراستیک اسید را انجام بیش از ۴۰ نوع واکنش شیمیایی توسط این ترکیب در میکروارگانیسم‌ها می‌دانند. مکانیسم عمل پراستیک اسید به‌عنوان ماده اصلی استریل کننده در سوپرپرسیدین بدین‌صورت است که باندهای سولفور و سولفیدریل در مولکول پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را پاره کرده و ترکیبات مهمی در سلول عملکرد خود را از دست می‌دهند. پراستیک اسید با مولکول‌های حاوی باندهای دوگانه واکنش داده و می‌تواند فعالیت اسمزی لیپوپروتئین غشاء سیتوپلاسمی را از طریق پاره کردن و ایجاد تغییر ساختاری در ساختمان دیواره سلولی از بین ببرد. پراستیک اسید می‌تواند آنزیم‌های ضروری سلول را اکسید کرده و راه‌های حیاتی بیو شیمیایی سلول و انتقال فعال از طریق غشاءها را مختل کند. آنزیم کاتالاز که برخی میکروارگانیسم‌ها با کمک آن هیدروژن پراکساید را غیرفعال می‌کنند، بر روی پراستیک اسید تاثیری ندارد و فعالیت آنزیم بتا-د- گالاکتوزید را کاهش می‌دهد. میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی نیز به‌خاطر عدم فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز نسبت به پراستیک اسید حساس هستند. همچنین، پراستیک اسید یک دناتوره کننده پروتئین است و بر ساختار اسید نوکلئیک سلول نیز اثرگذار است. رادیکال‌های آلی که از پراستیک اسید مشتق می‌شوند خاصیت اسپورکشی دارند و می‌توانند در مقابل اسپورها که حالت به شدت اکسید شده دارند به شکل یک ماده احیا کننده عمل کنند (اطلاعات ارائه شده همراه محصول توسط شرکت سازنده).

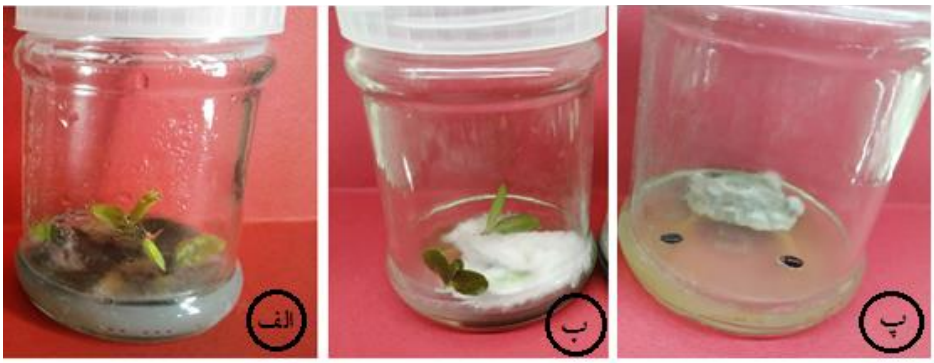
همان‌طور که گفته شد، در ریز نمونه بذر علاوه بر سوپرپر سیدین، آکوا پر سیدین نیز در کاهش آلودگی سطحی موثر بود. آکوا پر سیدین یک محلول ضدعفونی کننده قوی بر پایه هیدروژن پراکساید و یون نقره است که دارای قدرت اثرگذاری زیاد در نابودی میکروارگانیسم‌ها است. در مطالعات بسیاری خاصیت ضدمیکروبی ذرات نقره در شرایط کشت درون شیشه‌ای گزارش شده است که از جمله می‌توان به فغانی و رجالی (Faghani and Rajali, 2014) اشاره کرد که اثرات ضدعفونی کنندگی نانوذرات نقره را بر روی بذور جو مورد بررسی قرار دادند و نتایج مثبتی را گزارش نمودند. مکانیسم عمل نانو ذرات نقره در ضد عفونی بذور به دو صورت است: ۱) مکانیسم یونی: در این مکانیسم ذرات نانو نقره فلزی به مرور زمان، یون‌های Ag^{+} را از خود ساطع می‌کنند. این یون‌ها طی واکنش جانشینی، باندهای Hs^{-} را در جداره میکروارگانیسم‌ها به باندهای Ags^{-} تبدیل می‌کنند که در نتیجه این واکنش، تاتوره شدن اتفاق می‌افتد و میکروارگانیسم‌ها از بین می‌روند؛ ۲) مکانیسم کاتالیستی: این مکانیسم بیشتر در مورد کامپوزیت‌های نانو نقره- سمی کانداکتورها صدق می‌کند. ذرات نانو نقره روی پایه‌های نیمه هادی مانند TiO_2 یا SiO_2 قرار می‌گیرند. در این حالت پایه‌های نیمه‌هادی بدون نیاز به انرژی نور به‌دلیل کاهش سرعت الکترون‌ها بین لایه ظرفیت و لایه هدایت اتم به حالت پایداری از حضور ذرات پروتون و تراکم الکترون می‌رسند، در این وضعیت ذره، مانند یک پیل الکتروشیمیایی عمل می‌کند و با اکسید کردن اتم O_2 و با هیدرولیز H_2O، یون OH^{+} را تولید می‌کنند که هر دو از بنیان‌های فعال در گروه اکسیژن فعال هستند که از قویترین عاملین ضد میکروب نیز می‌باشند (Faghani and Rajali, 2014). لذا، با توجه به نتایج پروهش حاضر علاوه بر سوپرپرسیدین می‌توان از این محصول در حذف آلودگی سطحی بذور شمشاد از محصول آکواپر سیدین نیز بهره جست.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]



شکل ۱۰- مقایسه اثرات متقابل انواع استریل کننده‌های مورد استفاده در غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) در ریزنمونه بذر
Figure 10. Comparison of interactions effect of different sterilizers used in different concentrations (0, 1, 2 and 4%) in seed explants

در این آزمایش، تشخیص آلودگی‌های قارچی و باکتریایی به‌روش مورفولوژیکی به‌دلیل ایجاد علائم قابل مشاهده به‌راحتی با چشم غیر مسلح انجام شد. به‌طور خلاصه، منبع اصلی آلودگی در مطالعه حاضر منشا قارچی مشاهده شد (۹۹٪) و آلودگی باکتریایی (۱٪) بود. عامل بیماری قارچی عمدتاً سفید مایل به خاکستری و مشکی بودند که با تشخیص انجام گرفته از جنس‌های *Penicillium* sp.، *Cladosporium* sp.، *Fusarium* sp.، *Alternaria* sp. و *Botrytis* sp. بودند. همچنین، آلودگی‌های باکتریایی ایجاد ساختارهای مخاطی کردند که در همه موارد، حاکی از رشد تهاجمی و طاقت‌فرسای باکتری‌ها بود. بنابر تشخیص انجام گرفته باکتری جنس *Bacillus* sp. در محیط‌های کشت مشاهده شد (شکل ۱۱). آلودگی‌های مشاهده شده از جمله آلودگی‌های معمول در محیط کشت‌ها هستند (Odutayo *et al.*, 2007). از آنجایی که آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از جمله چالش‌های مهم در کشت بافت گیاهی محسوب می‌شوند کنترل و مهار آنها می‌تواند صرفه‌جویی بسیاری در زمان و هزینه‌های یک پژوهش به‌همراه داشته باشد.



شکل ۱۱- انواع آلودگی‌های مشاهده شده در محیط کشت بر روی ریزنمونه‌های سرشاخه و رنگ‌های مختلف آلودگی قارچی (الف و ب) و آلودگی باکتریایی و قارچی در کنار هم (پ)
Figure 11. Infections observed in culture medium on twig explants and different colors of fungal infection (a and b) and bacterial and fungal infections together (c)

نتیجه‌گیری کلی

کشت بافت گیاهی در آزمایشگاه، ابزار مناسبی برای رسیدن به هدف‌های ناممکنی است که در شرایط معمول خارج از شرایط درون‌شیشه‌ای امکان کشت و توسعه آنها وجود ندارد. کشت بافت گیاهی و تکثیر درون‌شیشه‌ای دارای اهمیت زیادی در کشاورزی، باغبانی و جنگلداری است. آزمایشگاه‌های کشت بافت سالیانه میلیون‌ها نهال درختان و گیاهان زینتی را تولید و به بازار عرضه می‌کنند. ضدعفونی از جمله مراحل بسیار مهم در کشت بافت گیاهی است که ایجاد کشت‌های عاری از آلودگی در هزینه و زمان صرفه جویی خواهد کرد. پروژه حاضر نتایج ارزشمندی را در خصوص حذف آلودگی‌های سطحی از ریزنمونه‌های سرشاخه و بذر با محصولات

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]

سوپرپرسیدین و آکواپرسیدین به‌دنبال داشت که با بهینه کردن آن می‌توان از این مواد برای دیگر گونه های گیاهی چوبی و غیرچوبی بهره جست.

تشکر و قدردانی

لازم ا ست از مدیریت محترم شرکت بهبان شیمی جناب آقای کرجالیان و همچنین ســرکار خانم دکتر کاویان و خانم دکتر حاتم‌زاده که زمینه انجام این پژوهش را فراهم آوردند، تشــکر و قدردانی گردد. همچنین، از زحمات جناب آقای دکتر ابوالفضــل فرجی ریاســت محترم مرکز تحقیقات کشــاورزی و منابع طبیعی گلســتان و آقای دکتر علیرضــا کیانی معاونت محترم سابق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان که ما رادر پیشــبرد اهداف این پژوهش یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

منابع

Dhar, U & Upreti, J. (1999). *In vitro* Regeneration of a mature leguminous liana (*Bauhinia vahlii* Wight & Arnott). *Plant Cell Rep*, 18, 664-669.

Faghani, E & Rajali, F. (2014). Study effect of Nano-silver seed disinfected on mycorrhizal symbioss and morphology of Barley root under drought stress. *Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 104, 48-54 (In Persian).

Farahani, S., Rasul, A., Salehi, M. & Arefipur, M. (2016). The report of new pest (Cydalima perspectalis (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae in Iran, *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research*, 14(1), 68-72 (In Persian).

Ghasemi Bezdi, K. & Ahmadi, A. (2008). Biotechnology of cell and tissue. Press of Makhdumghloi Faraghi, 254 pp (In Persian).

Mir Abbasi Leskokelaye, S. M & Hoseynpur, B. (2013). Comparison the effect of different levels of topulin hormone on *Ulmus glabra* propagation. The 1st national conference on solutions to access sustainable development in agriculture, natural resources and the environment, 10 March 2013, Tehran, Iran (In Persian).

Mir Abbasi Leskokelaye, S. M., Hoseynpur, B., Ghaem Maghami, A. & Ebrahimi, A. (2012). Optimization of tissue culture of Ulmus glabra, 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Conference, Mashhad, Iran (In Persian)

Mohamadzade, A., Payam Noor, V. & Kavosi, M. R. (2020). Evaluation type of explants and season of sampling under different disinfection treatments for the tissu culture of *Buxus hyrcana* Pojark. *Journal of Forest Research and Development*, 5(4), 527-540 (In Persian).

Niknejad, F., Morady, M. S., Keshtkar, A. A., Joshaghani, H. R., Mardani, A. & Moazeni M. (2011). *In vitro* Evaluation of Antifungal Activity of Peroxy Acetic Acid Component (Percidine) on a Group of Fungi. *Microbiology Journal*, 1(1), 40-45 (In Persian).

Odutayo, O. I., Amusa, N. A., Okutade, O. O. & Ogunsanwo, Y. R. (2007). Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, 2, 067-072.

Rajaei, E., Gerayli, Sh. & Hoseyni-e Nasr, S. M. (2013). Investigation of ecological, protective and economic status of boxwood forest species. The 3 confernce of environmental planning and management, 26 Novwmber 2013, Tehran, Iran (In Persian).

Read, P. E & Preece J. E. (2014). Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. In: Neal Van Alfen, editor-in-chief. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 2, 317-336.

Saeedi Heidari, A. & Safarnejad, A. (2015). Micropropagation of *Acer monospessulanum* through tissue culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 23(2), 237-246 (In Persian).

Singh, C. R. (2018). Review on problems and its remedy in plant tissue culture. *Asian Journal of Biological Science*, 11(4),165–72.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2026-04-22]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.22.9.7]
[DOI: 10.61186/ifej.11.22.12]