


Research Paper

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

Akram Ahmadi¹, Maryam Moslehi Jouybari², Saeid Shabani³, Sepideh Zavvar⁴,
Mohammad Karim Maghsudloo⁵ and Hojjatollah Rabbani Nasab⁶

- 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



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>



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 مقصدلو^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 ضدعفونی کننده‌های 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 به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. ابتدا به منظور اعمال پیش تیمار، ریزنمونه‌ها (سرشاخه و بذر) با آب معمولی و چند قطره مایع ظرفشویی به مدت پنج دقیقه جهت حذف آلودگی‌های سطحی مورد شستشوی اولیه قرار گرفتند. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در قارچ کش بنومیل (۱٪) قرار داده شدند. بعد از آیشویی، 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، ۴ درصد) در مقایسه با هیپوکلریت سدیم بودند. بعد از ضدعفونی ریزنمونه‌ها، مواد گیاهی بر روی محیط کشت موراشی و اسکوک قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در شرایط رشدی با دمای ۲۵±۱ 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: به نظر 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

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 گیاهی وارد کرده است (Farahani et al., 2016). شمشاد با توجه به مشکلاتی که گونه بالارزش شمشاد با آن روبرو است، ریز ازدیادی یکی از راه‌های تکثیر این گونه جنگلی است. ریز ازدیادی یکی از جنبه‌های تجاری استفاده از کشت درون شیشه‌ای است و مزایای زیادی نسبت به روش‌های متداول ازدیاد رویشی دارد (Ghasemi Bazdi and Ahmad, 2008). برای ریز ازدیادی 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 آنجایی که 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،

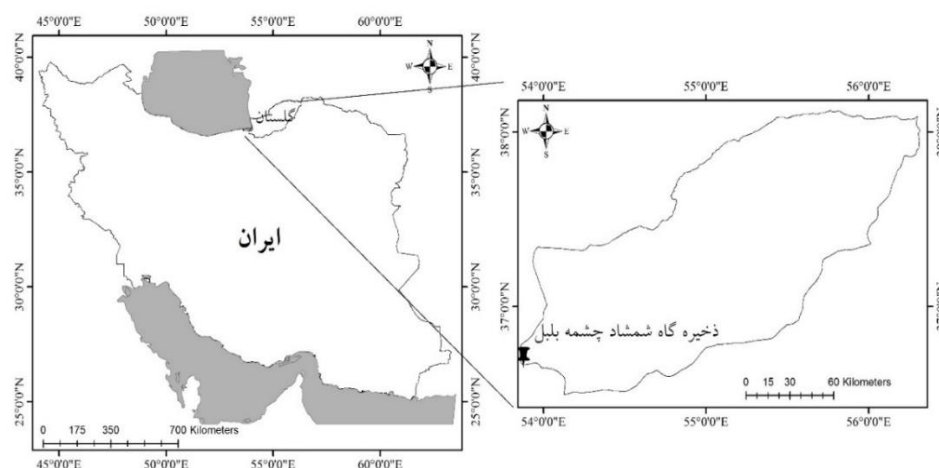
شمشاد هیرکانی جزو گونه‌های بومی و طبیعی جنگل‌های هیرکانی به‌شمار می‌رود و به‌همین دلیل اهمیت حفاظتی بسیار زیاد برخوردار است. شمشاد خزری یا شمشاد هیرکانی گونه‌ای پهن‌برگ و همیشه سبز است که در جنگل‌های شمال رویش دارد. درختی سایه‌پسند است و تحمل آفتاب شدید را ندارد. رشد شمشادهای هیرکانی بسیار کند و به سالی 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 (*Quercus 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).

۵ دقیقه برای پرسیدن ۲۰ در صد به دست آمد. طبق پروتکل ISIR ۶۹۸۶ موسسه استانداردها و تحقیقات صنعتی ایران، پراکسی استیک اسید (PAA) به دلیل 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 به حال 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 بهیان 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 درون شیشه‌ای انجام گرفت.

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 گلگاه در منطقه روستای چشمه بلبل و لیوان (طول جغرافیایی ۵۳° ۵۳' تا ۵۴° ۲۰' 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

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 بذر ها از داخل کپسول جدا شده و

موفقیت کشت را بالا برد می‌تواند صرفه‌جویی قابل توجهی را در زمان و هزینه پروژه داشته باشد (Ghasemi Bezdi and Ahmadi, 2008). در خصوص ضدعفونی ریزنمونه‌های 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 Leskokelate 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 Leskokelate et al., 2013) تحقیق دیگری بر روی بهینه‌سازی 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 پراکسی استیک اسید (PAA) به‌عنوان پرسیدین و پرسیدین ۵۱۳ را بر روی میکروسپوروم گچ، کاندیدا آلیکنس 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 *Microsporium 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

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.

سپس به مدت ۱۰ دقیقه در قارچ کش بنومیل (۱٪) قرار گرفتند. بعد از آب شویی، در زیر هود استریل، ضدعفونی ریزنمونه‌ها با تیمارهای آزمایشی در جهت کاهش آلودگی سطحی از ریزنمونه‌ها به صورت جدول (۱) در سه تکرار اعمال شد.

سرشاخه‌ها نیز به قطعات ۲-۳ سانتی متری برش داده شد. روش تحقیق: سه پایه درختی به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌گیری از این پایه‌ها انجام گرفت. ابتدا در آزمایشگاه به منظور پیش سترون‌سازی، ریزنمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب با چند قطره مایع ظرفشویی مورد شستشوی قرار گرفتند و

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 به مدت 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) به مدت 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 آکوا 15% (1، 2 و 4 درصد) به مدت 10 دقیقه و سپس سه بار شستشو با آب مقطر (10 دقیقه) Using 15% Percidine Aqua (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) به مدت 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) به مدت 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) به مدت 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) به مدت 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) به مدت 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) به مدت 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)

تاریکی قرار داده شدند. بررسی آلودگی (آماربرداری) به صورت هفتگی انجام گرفت و تا یک ماه ادامه داشت. در پایان، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی مورد شناسایی قرار گرفت.

بعد از ضدعفونی ریزنمونه‌ها، مواد گیاهی روی محیط کشت موراشی و اسکوگ قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در شرایط رشدی با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت



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*

تجزیه و تحلیل آماری

طرح آزمایشات تحقیق به صورت 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 به منظور انجام آنالیز چند متغیره، متغیرهای نوع ریزنمونه، ماده استریل کننده و غلظت استریل کننده 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 آریبی در داده‌ها، تیمار ۱۰ 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 نرمالیت داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بر روی باقی‌مانده‌های مدل انجام گرفت که نتایج حاکی از نرمال بودن داده‌ها بود ($p \geq 0.05$). جدول شماره (۲)، نتایج آنالیز واریانس چند متغیره داده‌های حاصل از مواد استریل کننده پرسیدین ۱۵٪، سوپرپر سیدین، پرسیدین پلاس، آکوپلاس 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 ($p \leq 0.01$)، همچنین، نتایج نشان داد که اثرات متقابل معنی‌داری بین نوع ریزنمونه × ماده ضدعفونی کننده، بین نوع ریزنمونه × غلظت ضدعفونی کننده ($p \leq 0.01$) وجود داشت ولی اثرات متقابل معنی‌داری در نوع ریزنمونه × ماده استریل کننده × غلظت وجود نداشت ($p \geq 0.05$).

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

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

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

(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، آکوپرسیدین و سوپرپر سیدین می‌باشد (شکل ۷). نتایج مقایسات میانگین نشان داد که در بین تیمارهای مختلف، سوپرپر سیدین ۲ و ۴ درصد تفاوت معنی‌داری در کاهش آلودگی سطحی از ریزنمونه سرشاخه داشت (به ترتیب ۸۴/۵ و ۸۹/۹ درصد کاهش آلودگی) (شکل ۸). لازم به ذکر است که غلظت ۴ درصد باعث قهوه‌ای شدن (سوخستگی 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. به طوری که 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).

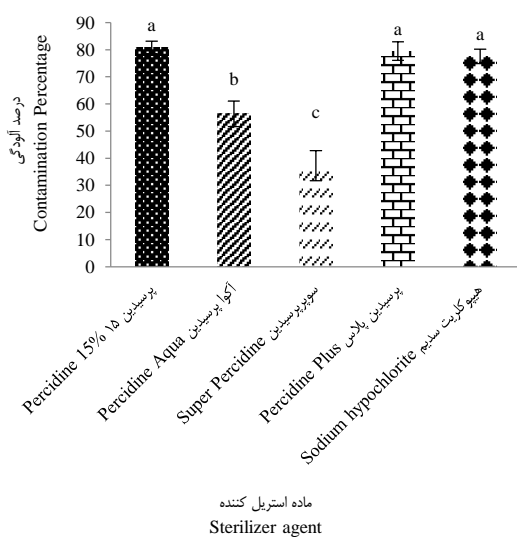
مقایسات میانگین داده‌ها نشان داد که میزان آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذر بود ($p \leq 0.01$) (شکل ۴). مقایسات میانگین داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ماده معمول در ضدعفونی کشت بافت (استفاده از هیپوکلریت سدیم) و استفاده از پرسیدین ۱۵٪ و پرسیدین پلاس وجود ندارد. از بین مواد مورد استفاده، سوپر پرسیدین نسبت به بقیه ضدعفونی کننده‌ها توانست آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌ها را به نحو موثر و معنی‌داری کاهش دهد (۶۳٪) (شکل ۵). لذا در ضدعفونی کننده‌های مختلف بدون توجه به نوع ریزنمونه، در صد آلودگی در هیپوکلریت سدیم، پرسیدین ۱۵٪، پرسیدین پلاس بیش از آکوپرسیدین 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 به طوری که کمترین آلودگی در سطح ۴ درصد و بیشترین آلودگی در تیمار شاهد مشاهده شد که با افزایش غلظت، میزان آلودگی کاهش یافت

پایین نیز موثر بوده است (Mir Abbasi Leskokelaye *et al.*, 2012) ولی در گونه جنگلی شمشاد به دلیل آلودگی بسیار در بوم‌سازگان جنگلی این استریل کننده کارایی چندانی نداشت اما سوپرپرسیدین با داشتن مواد موثره‌ای همچون پراکسی استیک اسید، حاوی هیدروژن پراکساید و اسید استیک گلا سیال (رفرنس) کارایی بالاتری در ضدعفونی ریز نمونه سرشاخه نشان داد. از طرفی، در ریزنمونه سرشاخه، سوپرپرسیدین ۲٪ کارایی خوب و مناسبی را در کاهش آلودگی نشان داد در صورتی که سوپر پرسیدین ۴ درصد علی‌رغم کاهش بیشتر آلودگی بدلیل ایجاد سوختگی و اثر بر روی زنده‌مانی ریزنمونه گزینه مناسبی نبود که احتمالاً به دلیل افزایش میزان ماده موثره استریل کننده می‌باشد. 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٪ پرسیدین و پرسیدین ۵۱۳ را به مدت ۱۰ دقیقه در کنترل گروهی از قارچ‌ها از جمله میکروسپوروم گچ و کاندیدا آلیکنس مناسب تشخیص دادند ولی بر روی ماده سوپرپرسیدین گزارش مدون علمی یافت نشد.

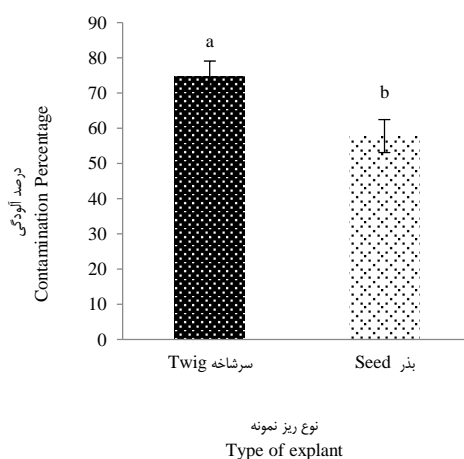
ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده از بوم‌سازگان‌های طبیعی آلودگی‌های سطحی بسیاری دارند و کنترل آلودگی‌های آن از جمله مشکلات بزرگ در کشت بافت گیاهی است (Dhar and Upreti, 1999).

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

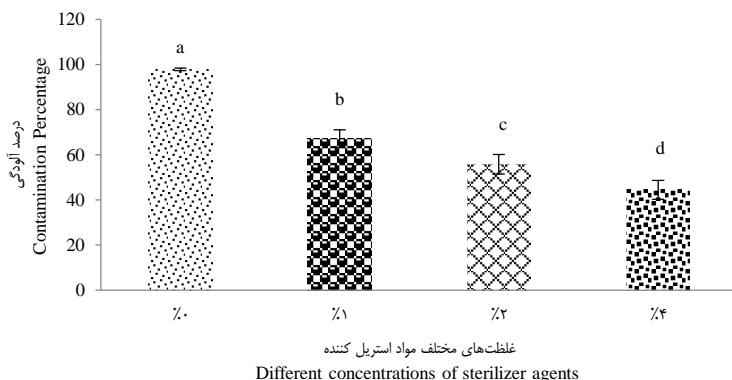
طبق ISIR (پروتوکل ۶۹۸۶ موسسه استاندارد‌ها و تحقیقات صنعتی ایران)، PAA^۱ به دلیل قدرت بالای آن در کاهش شدت جمعیت میکروبی خصوصاً در مهمترین گونه‌های قارچ می‌تواند به‌عنوان یک ضدعفونی کننده قابل اطمینان برای استفاده در کاربردهای عمومی در نظر گرفته شود (Niknejad *et al.*, 2011). اگرچه در بسیاری از پژوهش‌ها استفاده از پرسیدین (پراکسی استیک اسید) حتی در درصدهای



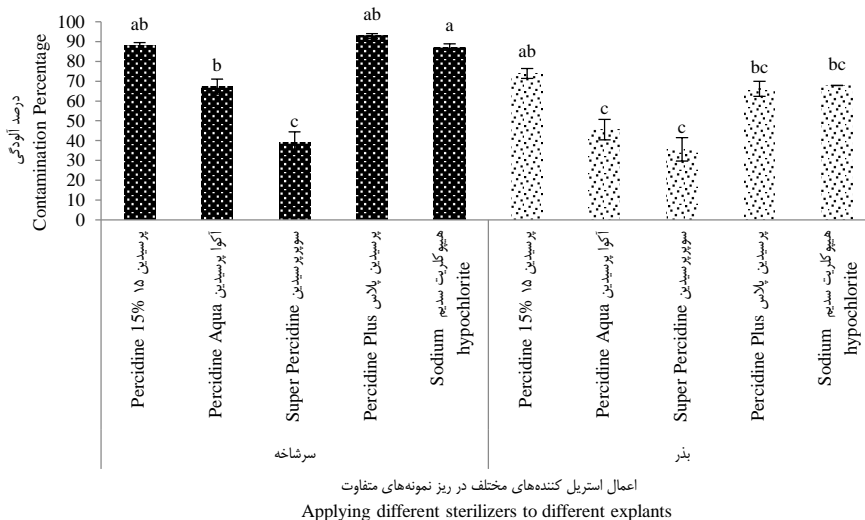
شکل ۵- مقایسه میانگین داده‌های استریل کننده‌های مختلف
Figure 5. Compare means of data of different sterilizers



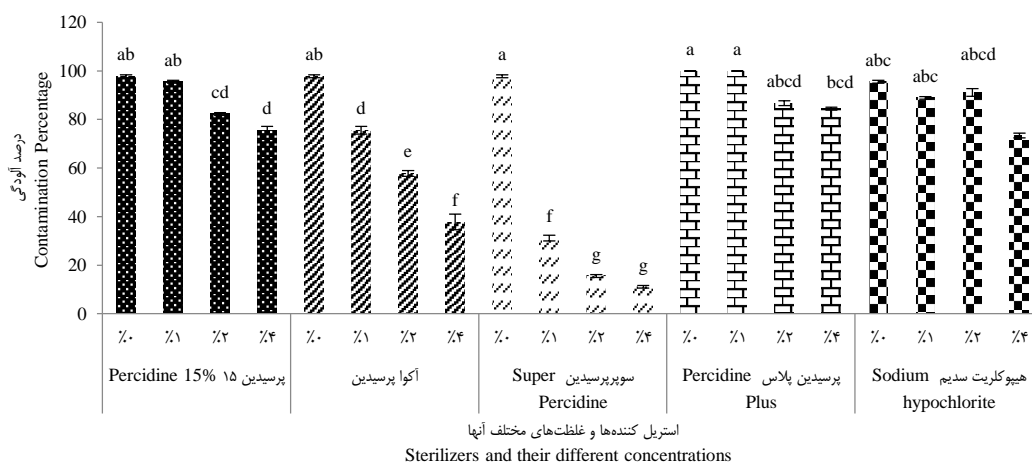
شکل ۴- مقایسه میانگین درصد آلودگی در دو ریزنمونه سرشاخه و بذر
Figure 4. Compare means of infection Percentage in twigs and seeds



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



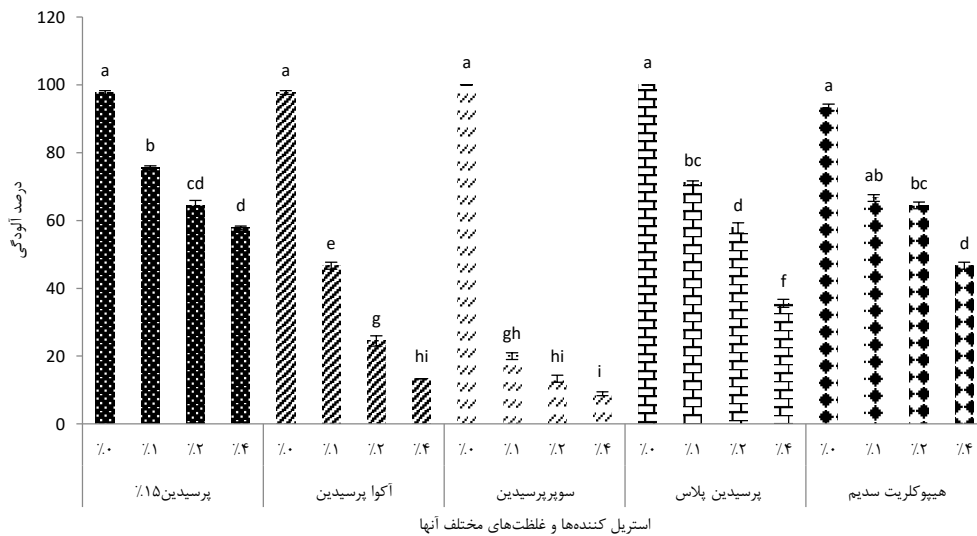
شکل ۹- سوختگی ریزنمونه سرشاخه در سوپرپرسیدین ۴٪
Figure 9. Twig explant burning in super Percidine 4%

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 بذری علاوه بر سوپرپرسیدین، آکوا پرسیدین نیز در کاهش آلودگی سطحی موثر بود. آکوا پرسیدین 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 ضد میکروبی 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 ضدعفونی‌کنندگی 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 کاتالیزستی: 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 نیمه هادی بدون نیاز به انرژی نور به دلیل 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 پژوهش حاضر علاوه بر سوپرپرسیدین می‌توان از این محصول در حذف آلودگی سطحی بذور شمشاد از محصول آکواپرسیدین نیز بهره جست.

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

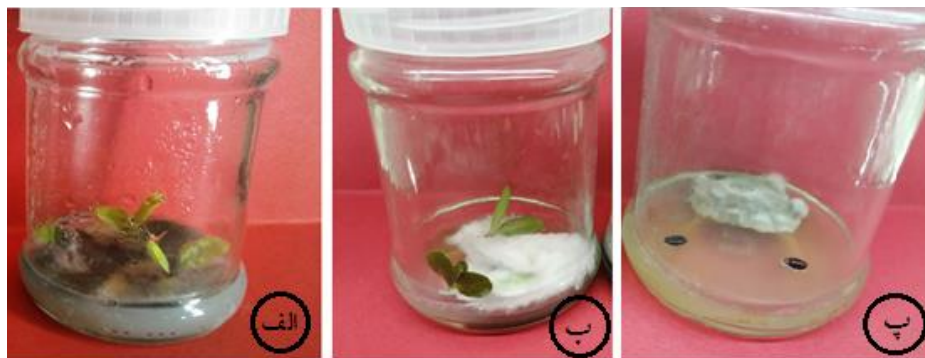
نتایج بررسی اثرات متقابل در ریزنمونه بذری نشان داد که در تیمار شاهد بیشترین میزان آلودگی مشاهده شد و کمترین آلودگی در غلظت‌های مختلف سوپر پرسیدین (۲ و ۴٪) (به ترتیب ۸۶/۷ و ۸۱/۲ درصد کاهش آلودگی سطحی) و آکوا پرسیدین (۴) (۸۶/۶۷ درصد کاهش آلودگی سطحی) اتفاق افتاد (شکل ۱۰). همان‌طور که قبلاً اشاره شد، مواد موثره در ماده استریل کننده سوپرپرسیدین شامل پراستیک اسید، هیدروژن پراکساید و اسید استیک گلاسیال است. پراستیک اسید با توجه به طیف و سبب 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 بدین صورت 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 لیوپروتئین 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 بیوشیمیایی 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 تأثیری 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



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

ساختارهای مخاطی کردند که در همه موارد، حاکی از رشد تهاجمی و طاق‌فرسای 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.

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 منشأ 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.، *Alternaria* sp.، *Fusarium* sp.، *Cladosporium* sp. و *Botrytis* sp. بودند. همچنین، آلودگی‌های باکتریایی ایجاد



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)

کشت بافت سالبانه 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

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

دکتر حاتم‌زاده که زمینه انجام این پژوهش را فراهم آوردند، تشکر و قدردانی گردد. همچنین، از زحمات جناب آقای دکتر ابوالفضل فرجی ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان و آقای دکتر علیرضا کیانی معاونت محترم سابق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان که ما را در پیشبرد اهداف این پژوهش یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

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

تشکر و قدردانی

لازم است از مدیریت محترم شرکت بهیان شیمی جناب آقای کرجالیان و همچنین سرکار خانم دکتر کاویان و خانم

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 symbiosis 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 tissue culture of *Buxus hyrcana* Pojark. *Journal of Forest Research and Development*, 5(4), 527-540 (In Persian).
- Niknejad, F., Morady, M. S., Keshkar, 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 conference of environmental planning and management, 26 November 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 monspessulanum* 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.