بررسی تیمارهای مختلف ضدعفونی بر روی ریزنمونه‌های قره‌قاط

بهناز رضازاده[۱]، علیرضا قنبری[۱*]، یونس پور بیرامی‌هیر[۱] و روح‌اله حق جویان[۲]

[۱] ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم باغبانی

[۲] ایران، کرج، موسسه تحقیقات علوم باغبانی کرج

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۷ تاریخ پذیرش:۹۸/۱/۲۸

چکیده

گیاه کرن‌بری با نام محلی قره‌قاط ازخانواده‌ی اریکاسه (یا تیره قره‌قاط) می‌باشد. میوه گیاه قره‌قاط سته و کروی شکل بوده و به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتوسیانینی، فلاونوئیدی، ضدسرطان و ضد میکروبی از ارزش تجاری بالایی برخوردار است. این تحقیق به منظور بررسی روش‌های ضدعفونی ریزنمونه‌های گیاه قره‌قاط در قالب سه آزمایش مختلف صورت گرفت. در آزمایش اول ضدعفونی ریزنمونه‌های پنج اکوتیپ مختلف حوران، سوها، خلخال (استان اردبیل)، و لیسار و پره‌سر (استان گیلان) طبق جدول ۱ و آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح تصادفی مورد بررسی قرارگرفتند. در آزمایش دوم تأثیر تغییر pH محلول ضدعفونی شامل (۶/۵، ۹، ۱۱/۵و۱۴)، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش سوم به بررسی تأثیر تتراسایکلین و نیترات نقره در ضدعفونی ریزنمونه‌های قره‌قاط، نیترات‌نقره ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، تتراسایکلین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و ترکیبی از تتراسایکلین و نیترات‌نقره هرکدام به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در آزمایش اول اکوتیپ لیسار بعنوان بهترین اکوتیپ در ریزنمونه‌های سالم، در آزمایش دوم pH=۹ بهترین عملکرد در ریزنمونه‌های سالم، و در آزمایش سوم نیترات نقره بیشترین میزان ریزنمونه‌های سالم را داشت.

واژه های کلیدی: آنتوسیانین،اکوتیپ، تتراسایکلین، فلاونوئید، نیترات نقره

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۴۷۹۲۳۳، پست الکترونیکی: ghanbari66@yahoo.com

مقدمه

آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در زمره شدیدترین آلودگی های محیط‌کشت هستند و یک چالش اصلی برای انجام کشت درون شیشه‌ای و تکثیر گیاهان به ویژه گیاهان چوبی با استفاده از کشت بافت و اندام می‌باشد. این موجودات به سرعت و زودتر از مواد گیاهی رشد یافته و شرایط تعریف شده محیط کشت را تغییر داده و باعث رشد ضعیف یا مرگ ریزنمونه‌ها می‌شوند (۱۸). با وجود گستردگی گونه‌ها و پراکنش وسیع تیره قره‌قاط و جنس وکسینیوم در جهان تنها گونه *V. arctostaphylosv L* از این جنس در ایران رویش دارند. گسترش طبیعی این گونه در دنیا محدود به مناطق خاص قفقاز و ایران بوده و این مناطق یکی از بهترین رویشگاه‌های آن بشمار می‌رود از جمله گونه‌های مهم این جنس می‌توان به *V. arctostaphylos* اشاره کرد که دراکثرنواحی جنگلی آسیای صغیر، قفقاز و بخشی‌هایی از اروپا یافت می‌شود. خاستگاه اصلی *V. arctostaphylos* مربوط به راشستان جنگل‌های شمال ایران می‌باشد که شامل اکوتیپ‌های قره‌قاط اردبیلی و کلیبری می‌باشد. اکوتیپ اردبیلی آن در ارتفاعات استان اردبیل، تالش، اسالم و کلاردشت گسترش یافته است (۱).

زمانی که از ریزنمونه‌های رشد یافته در شرایط طبیعی برای کشت درون‌شیشه‌ای استفاده شود کنترل آلودگی آن بویژه آلودگی‌های میکروبی داخلی اهمیت بسیاری پیدا می‌کند. بطوری که اگر برای مقابله با این بیماری‌ها راهکارهای

مناسبی بکار گرفته نشود، بصورت آلودگی‌های قارچی و باکتریایی بروز پیدا کرده و کل ریزنمونه‌ها را از بین می‌برد (۲۳). منشأ آلودگی می‌تواند سایر گیاهان و یا عوامل مربوط به شرایط محیطی باشد که بروز آن به نوع گونه، سن و منشأ ریزنمونه در شرایط آب و هوایی وابستگی زیادی دارد. از جمله مواردی که باعث کاهش میزان آلودگی ریزنمونه‌های رشد یافته در شرایط آب و هوایی می‌شود، انتخاب زمان مناسب برای تهیه ریزنمونه است که می‌تواند میزان آلودگی را ۳ الی ۱۵ درصد کاهش دهد که در مقیاس تجاری و علمی بسیار اهمیت دارد. هر چند استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و آنتی میکروب‌ها در کنترل آلودگی گیاهان چوبی استفاده می‌شود ولی استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌میکروب‌ها برای جلوگیری از بیماری، منجر به کاهش رشد گیاه و تقویت اندام‌های سخت درون گیاهی می‌شود (۱۵). هم‌چنین، یکی از مشکلاتی که در کشت‌درون‌شیشه‌ای گیاهان جنگلی بخصوص در گیاهان چوبی مشاهده می‌گردد عدم یکنواختی پاسخ به شرایط درون‌شیشه‌ای نسبت به زمان برداشت ریزنمونه می‌باشد، که باتوجه به ساختار فیزیولوژیکی متفاوت در طی فصول مختلف سال این امر بدیهی است (۵). در رابطه با استفاده از الکل ۷۰ درصد عنوان شده است که باعث می شود لایه یمومی سطح کوتیکول حذف شده و محلول ضدعفونی کننده اصلی قدرت نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت نمونه‌ها داشته باشد (۱۴). هیپوکلریت‌سدیم جزء مواد ضدعفونی کننده مؤثری است که در اکثر روش‌های ضدعفونی مورد استفاده قرارگرفته است. استفاده از این ترکیب بدلیل سمیت کمتر در مقایسه با کلریدجیوه و نانو ذرات‌نقره از کارآیی بالایی برخوردار است و در غلظت‌های مختلفی و در انواع آزمایش‌ها مورد استفاده قرارگرفته است. مطالعات متعدد نشان داده است که این ترکیب کمترین تأثیر را روی رشد ریزنمونه‌ها دارد. سمیت کمتر این ترکیب باعث گردیده که از آن برای ضدعفونی بذر نیز استفاده شود. بذرهای گیاه *H. niger* L پس از ضدعفونی با اتانول ۹۶ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس محلول هیپوکلریت سدیم حاوی (1 %v/v کلرفعال) به همراه دو قطره توئین ۸۰ به مدت ۵ دقیقه، با آب مقطراستریل شستشو داده شدند (۲). در کشت‌بافت بسته به نوع ریزنمونه، چوبی یا علفی بودن ریزنمونه و زمان برداشت آن‌ها از غلظت‌های یک الی ۵ درصد استفاده می‌شود (۱۵). روش‌های مختلف ضدعفونی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل آلودگی در محیط درون‌شیشه‌ای مورد استفاده و توصیه شده است، ولی برخی از این‌ها بهره وری پایینی و برخی هم اثرات سمی زیادی روی ریزنمونه‌ها دارند. ترکیب آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با تیامین و جنتامایسین در محیط کشت، مانع از رشد باکتری-های داخلی ریزنمونه‌های مرکبات و دیگر درختان مثمر گزارش شده است (۲۳). کنترل آلودگی باکتریایی در ریز نمونه‌های زیتون با استفاده از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم به-میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میسر گردید (۶). ضد عفونی ریزنمونه‌های ریزوم و نوک شاخساره گیاه موز برای کشت درون‌شیشه‌ای توسط آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، آلودگی باکتریایی درونی را حذف کرده، بهترین نتیجه با تیمار ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در مدت یک ساعت و چهل دقیقه گزارش گردید (۱۳). استفاده از کلرید جیوه با غلظت ۰/۱ درصد به همراه چند قطره توین۲۰ به مدت ۴ دقیقه، به نتایج قابل توجهی در زمینه‌ی ضدعفونی زغال اخته گونه ی Macrocarpa بدست آمد (۱۲). سرشاخه‌های پایه رویشی پسته قزوینی (*P. vera, cv* ."Ghazvini") قطعات ساقه دارای ۲-۱ جوانه حدود ۲ ساعت در زیرآب جاری شستشو، سپس با الکل ۹۶ درصد به مدت ۴-۳ ثانیه و کلرید جیوه ۵ درصد به مدت ۴-۳ دقیقه ضدعفونی و در نهایت ۳ مرتبه با آب مقطراستریل شستشو شدند (۷). نانو ذرات‌نقره مواد سمی هستند که از قابلیت بالایی برای از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، بعنوان مثال، قارچ و باکتری‌ها برخوردار هستند. اثرات مضر نانو ذرات‌نقره در بیش از ۶۰۰

میکروارگانیسم گزارش شده است. این قابلیت نانو ذرات نقره بعلت ذرات کوچک آزاد نقره می‌باشد. این ذرات کوچک پس نه تنها قادر به از بین بردن باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشند، بلکه ویروس‌ها را نیز نابود می‌کنند (۲۶). بنومیل در حالت محلول دو ترکیب مهم methyl-2-benzimidazolacarbanat و butyl isocyanate را تولید می‌کند که روی مسیر تنفسی و انرژی‌زایی سلول‌های قارچ اثر می‌گذارد. استفاده از غلظت‌های بالا برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها می‌تواند روی ریزنمونه نیز اثر منفی بگذارد (۲۱). استفاده از پیش تیمار بنومیل به دلیل خاصیت سیستماتیکی امکان کاهش درصد آلودگی را داشته ولی این امر بستگی زیادی به غلظت بنومیل درون محیط کشت و مدت زمان غوطه‌وری ریزنمونه‌ها در آن دارد به گونه‌ای که در غلظت بالا و مدت زمان طولانی‌تر به همان نسبت که میزان آلودگی کاهش می‌یابد، میزان زنده‌مانی و رشد ریزنمونه‌ها به تأخیر افتاده و یا از بین می‌رود (۱۹). در این آزمایش برای اولین بار از نانونقره درجهت ضدعفونی یک گونه *Vaccinium* استفاده شده است و هیچ‌گونه گزارش قبلی حتی روی گونه‌های مشابه نیز وجود ندارد. این تحقیق به منظور بررسی تأثیر روش‌های مختلف ضدعفونی برای حذف آلودگی‌های میکروبی در ارزیابی استقرار و پرآوری ریزشاخساره‌های گیاه *V. arctostaphylos*. انجام گردید.

مواد و روشها

آزمایش اول: ضدعفونی ریزنمونه‌ها با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم، کلریدجیوه و نانو نقره

ریزنمونه‌های قره‌قاط گونه‌ی *V. arctostaphylos* تهیه شده، از پنج منطقه مختلف شامل سه منطقه سوها (اکوتیپ سوها)، خلخال (اکوتیپ خلخال) و حوران (اکوتیپ حوران) واقع در استان اردبیل و دو منطقه پره‌سر (اکوتیپ پره‌سر) و لیسار (اکوتیپ لیسار) واقع در استان گیلان جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه کشت‌بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی انتقال یافت. از شاخه‌های جمع‌آوری شده، ریزنمونه‌های حاوی یک تا دو جوانه شامل جوانه‌های جانبی و انتهایی تهیه شد و بمدت یک ساعت در زیر آب‌جاری قرار گرفته و سپس ریزنمونه‌ها تحت تیمارهای مختلف ضدعفونی به شرح جدول ۱ قرار داده شدند. از محیط‌کشت پایه‌ی WPM حاوی یک میلی-گرم‌بر لیتر BAP همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار جهت کشت ریزنمونه-های استریل شده استفاده گردید. pH محیط کشت روی ۵/۵ تنظیم و به مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید. ریزنمونه‌ها در شیشه‌های مربایی قابل اتوکلاو حاوی ۲۵ سی‌سی محیط تهیه شده، کشت گردیدند به‌طوری‌که در هر شیشه‌ی آزمایش چهار ریزنمونه قرار داده شد. ریزنمونه‌ها بعد از کشت در محیط کشت مذکور در اتاق رشد تحت شرایط محیطی با دمای $25\pm2^{o}c$ و ۱۶/۸ساعت تاریکی/روشنایی با لامپ‌های سرد- سفید ($65/5\mu mol\ m^{-1}S^{-1}$) نگهداری شدند. شمارش تعداد ریزنمونه‌های سالم و آلوده پس از چهار هفته انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت.

آزمایش دوم: تأثیرپیش‌تیمار با بنومیل و ضدعفونی با تغییر pH هیپوکلریت‌سدیم بر میزان آلودگی ریزنمونه-های قره‌قاط

ابتدا آزمایشی برای به دست آوردن مناسب‌ترین pH برای هیپوکلریت سدیم طراحی گردید به این ترتیب که ۴ سطح pH شامل (۶/۵، ۹، ۱۱/۵و۱۴) و هر سطح از pH در چهار تکرار همرا با تأثیر پیش تیمار ریزنمونه‌ها با ۳ گرم بر لیتر بنومیل به مدت ۳ ساعت مورد ارزیابی قرارگرفت. تغییر pH با استفاده از اسید استیک و سدیم دو دسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate) صورت گرفت. نحوه ضدعفونی ریزنمونه‌ها به شرح ذیل است.

ریزنمونه‌های قره‌قاط بحالت معمول ابتدا با محلول ظرف-شویی به مدت ۳۰ دقیقه شست‌وشو داده شد و زیر آب جاری به مدت یک ساعت آبکشی شدند. سپس در محلول ۳ گرم بر لیتر بنومیل به مدت ۳ ساعت غوطه‌ور شدند. بعد از آن ریزنمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم با pH (۶/۵، ۹، ۱۱/۵و۱۴) و حاوی 20Tween به مدت ۱۵ دقیقه، تیمار شد. پس از سه بار آبکشی ریز نمونه‌ها با آب مقطر استریل روی محیط‌کشت 1/2 MS در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی گرم بر لیتر IAA که از طریق اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر بمدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده بودند قرارگرفت.

باتوجه به نتایج حاصل از این آزمایش، که برای بررسی نحوه ضدعفونی ریزنمونه‌ها در مرحله استقرار استفاده گردید بعد از این مرحله باتوجه به نتایج این آزمایش اولیه آزمایشی دیگر طراحی شد با هدف حفظ ریزنمونه‌های مادری و تنها از سطح (pH=۹) برای بدست آوردن ریزنمونه برای مرحله پرآوری استفاده شد.

آزمایش اولیه بررسی ۴ سطح pH در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (پنج ریزنمونه در هر تکرار) انجام گرفت. تعداد ریزنمونه‌های با آلودگی قارچی و باکتریایی و تعداد ریزنمونه‌های زنده و رشد کرده حدود ۲۸ روز پس از کشت باتوجه به آلودگی‌های مشخص شده که در تصاویر مربوط به این تیمار نیز مشخص می‌باشد ثبت گردید.

آزمایش سوم: تأثیر نیترات‌نقره و تتراسایکلین بعنوان پیش تیمار و روش استریل در ضدعفونی ریزنمونه‌های قره‌قاط

در ابتدا به منظور تشخیص عوامل آلودگی نمونه‌هایی به آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی انتقال داده شد با توجه به نتایج آزمون‌های تشخیصی (با استفاده از میکروسکوپ)، با توجه به علائم در زیر میکروسکوپ، باکتری تشخیص داده شد و بعد بصورت کشت‌باکتری ریزنمونه‌ها و استفاده از دیسک‌های آنتی باکتریال مختلف که شامل جنتامایسین، استرپتومایسین، کوآموکسی‌کلاو، تتراسایکلین، سفالکسین و پنی‌سیلین صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا ریزنمونه آلوده در زیر هود میکروبیولوژی خرد شده و در داخل ظروف پتری سترون سترپل به همراه آب مقطر اتوکلاو شده به مدت یک ساعت قرارگرفت سپس با استفاده از لوپ از این سوسپانسیون درون محیط‌کشت باکتری (Nutrient Agar) کشت داده شد باکتری رشد یافته در این محیط بعد از ۴ روز به محیط‌کشت (Nutrient Agar) و بصورت خالص سازی انتقال داده شد. سپس مرحله افزودن دیسک‌های آنتی باکتریال بعد از ۴ روز صورت گرفت. بعد از یک هفته چرخه رشدی باکتری در ظروف پتری حاوی تتراسایکلین متوقف گردید (شکل ۱).

تأثیر پیش تیمار نیترات‌نقره ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، تتراسایکلین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و ترکیبی از تتراسایکلین و نیترات‌نقره هر کدام به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بمدت ۲۴ساعت و ریز نمونه‌های شاهد به همین مدت و در آب خالی مورد ارزیابی قرارگرفت. در این روش میزان سوختگی در ریزنمونه نسبت به زمانی که از این ترکیبات به صورت مستقیم در ضدعفونی ریزنمونه‌ها استفاده می شد به طور چشم‌گیری کاهش یافت. نحوه ضدعفونی ریزنمونه‌ها به شرح زیر است: ابتدا ریزنمونه‌ها درون آب دیونیزه با قیچی باغبانی برش داده شد و درون ترکیب تتراسایکلین، نیترات‌نقره و ترکیب تتراسایکلین و نیترات-نقره به مدت ۲۴ ساعت قرارگرفت. ریزنمونه‌ها بمدت ۳۰ دقیقه با محلول ظرف‌شویی شست‌وشو داده شد. سپس بمدت یک ساعت زیر آب آبکشی شدند. در مرحله بعد ریزنمونه‌های هر تیمار در محلول ۱/۵گرم بر لیتر بنومیل بمدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. بعد از این مرحله ریزنمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه استریل شده و یک بار بمدت یک دقیقه آبکشی گردید و سپس با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد حاوی Tween20 درصد به-

مدت ۱۵ دقیقه، تیمار شده و پس از سه بار آبکشی با آب مقطر استریل روی محیط‌کشت قرارگرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار (۵ ریزنمونه در هر تکرار) در تیمار انجام گرفت. تعداد ریزنمونه‌های دارای آلودگی قارچی و باکتریایی و تعداد ریزنمونه‌های رشد کرده حدود ۲۸ روز پس از کشت ثبت گردید.

نتایج

آزمایش اول

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها از نظر درصد ریزنمونه های سالم، آلوده و سوخته وجود دارد. همچنین نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که درصد ریزنمونه‌های سالم در اکوتیپ لیسار بیشترین میزان بود و بعد از آن اکوتیپ خلخال، حوران، سوها و پره سر قرار داشتند.

همچنین براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ضدعفونی مشاهده گردید. بطوری‌که آزمون مقایسه میانگین دانکن نشان داد تیمار T_7 (الکل ۷۰ درصد + نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) با ۶۰ درصد ریز نمونه سالم عملکرد بهتری در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. در این آزمایش نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد تیمارT_5 (الکل ۷۰ درصد + کلرید جیوه ۰/۲درصد + هیپوکلریت ۲۰ درصد حجمی) بیشترین میزان آلودگی ۱۲/۵ درصد و تیمار T_6 (الکل ۷۰ درصد +کلرید جیوه ۰/۲ درصد+ نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین میزان ریزنمونه‌های سوخته با ۴۸/۷۵ درصد را داشتند.

آزمایش دوم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین تیمارهای مختلف (سطح pH) در ضدعفونی ریز نمونه‌های قره‌قاط وجود دارد بطوری که (جدول ۴) تیمار pH_2 (pH=۹) با ۸۰ درصد ریز نمونه سالم بهترین عملکرد را در ریزنمونه‌های سالم، تیمار pH_4 (pH=۱۴) بعنوان شاهد با ۴۵ درصد ریزنمونه آلوده بیشترین میزان ریزنمونه‌ها با آلودگی باکتری را دارا بودند و تیمار (pH=۶/۵) با ۷۵ درصد ریزنمونه سوخته بیشترین درصد ریزنمونه‌های سوخته را داشتند در آلودگی قارچی تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد.

آزمایش سوم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای مختلف (نیترات‌نقره، تتراسایکلین و تتراسایکلین + نیترات‌نقره) وجود دارد بطوری‌که بیشترین تعداد ریز نمونه‌های سالم مربوط به تیمار نیترات‌نقره و بیشترین تعداد ریزنمونه‌های دارای آلودگی باکتریایی مربوط به شاهد بود و تیمار (تتراسایکلین + نیترات‌نقره) دارای بیشترین آلودگی قارچی در ریزنمونه-ها بود.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده در ضدعفونی ریزنمونه‌های قره‌قاط در پنج منطقه مختلف (حوران، سوها، خلخال، لیسار و پره‌سر)

کدتیمار	موادضدعفونی کننده
T_1	الکل ۷۰ درصد +کلرید جیوه ۰/۲ درصد+هیپوکلریت ۱/۵ درصد + نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر
T_2	الکل ۷۰ درصد +هیپوکلریت ۱/۵ درصد + نانونقره ۱۰۰ میلی گرم در لیتر
T_3	الکل ۷۰ درصد +کلرید جیوه ۰/۲ درصد+ هیپوکلریت ۱/۵ درصد + نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر
T_4	الکل ۷۰ درصد +کلرید جیوه ۰/۲ درصد+ هیپوکلریت ۱/۵ درصد + نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر
T_5	الکل ۷۰ درصد +کلرید جیوه ۰/۲ درصد+ هیپوکلریت۱/۵ درصد
T_6	الکل ۷۰ درصد +کلرید جیوه ۰/۲ درصد+ نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر
T_7	الکل ۷۰ درصد + نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر

جدول ۲-تجزیه واریانس تیمارها و مناطق مختلف بر ریزنمونه‌های قره‌قاط

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات		
		سالم	آلوده	سوخته
محیط	۴	۲۳۶۱/۶۰**	۴۱۹/۶۴*	۱۲۰۰/۸۹**
تیمار	۶	۶۳۳/۹۲*	۱۹۱/۹۶^{ns}	۷۹۶/۱۳*
تیمار×محیط	۲۴	۱۴۳۱/۹۱**	۱۶۹/۶۴^{ns}	۱۴۸۹/۹۵**
خطا	۱۰۵	۲۵۷/۶۱	۱۲۰/۳۶	۳۲۴/۷۵

*، **، ns معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیرمعنی دار

جدول ۳-تجزیه واریانس اثر pH های مختلف در ضد عفونی قره‌قاط

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	میانگین مربعات			
		سالم	باکتری	قارچ	سوخته
تیمار	۳	۲۵۵۸/۳۳**	۱۹۵۸/۳۳**	۱۶۶/۶۶^{ns}	۵۲۲۵**
خطا	۱۲	۲۲۵	۷۵	۸۳/۳۳	۵۸/۳۳

*، **، ns معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیر معنی دار

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف pH محلول ضدعفونی در شاخص های تیمار ضد عفونی قره‌قاط

تیمار	سالم	باکتری	سوخته
PH_1	^{c}۲۰	^{b}۵	^{a}۷۵
PH_2	^{a}۸۰	^{b}۰	^{b}۱۰
PH_3	^{b}۵۵	^{a}۳۵	^{b}۰
PH_4	^{bc}۴۰	^{a}۴۵	^{b}۰

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) نمی‌باشند

جدول۵- تجزیه واریانس اثر تیمارهای (نیترات‌نقره، تتراسایکلین و تتراسایکلین + نیترات‌نقره) در ضد عفونی گیاه قره‌قاط

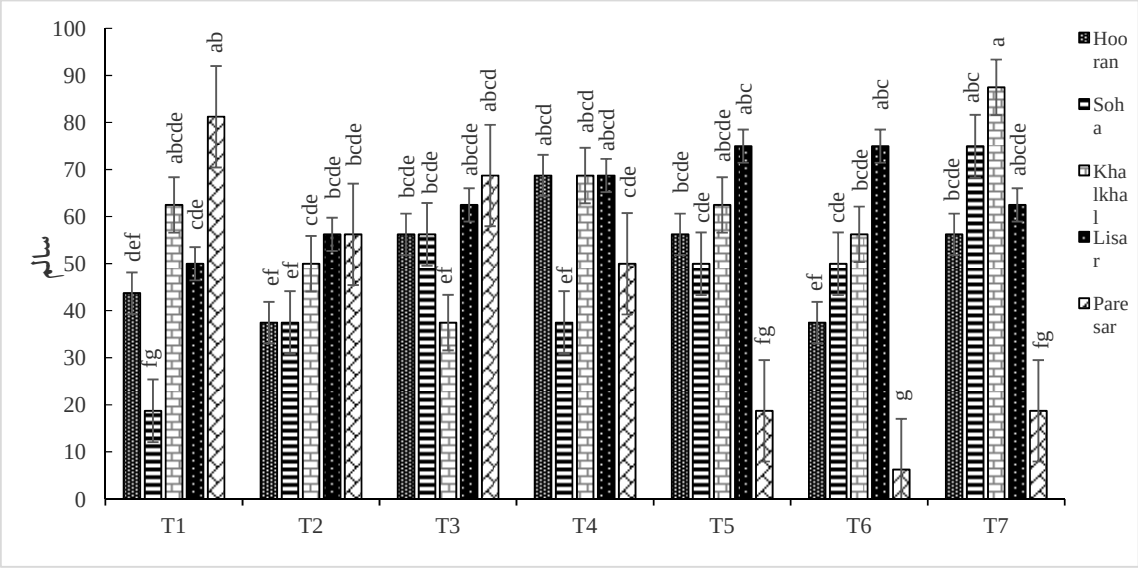
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سالم	آلوده	سوخته
تیمار	۳۵	۸۲۸۳/۳۳**	۸۳/۴۷۴۵**	۹۴۵/۴۳*
خطا	۲۸	۲۶۷/۸۵	۹۲/۱۳۳	۲۱۶/۰۷

*، **، ns معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

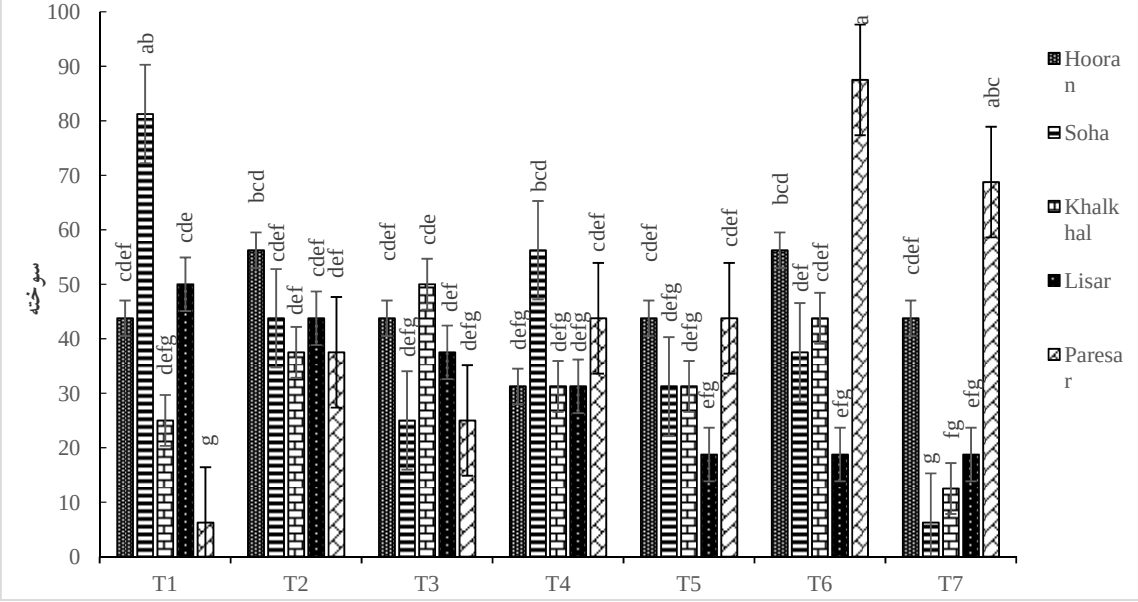
شکل۱- کشت باکتری: الف) باکتری در مرحله کشت ب) باکتری در مرحله خالص سازی پ) باکتری در مرحله اضافه کردن دیسک آنتی باکتریال

بحث و نتیجه گیری

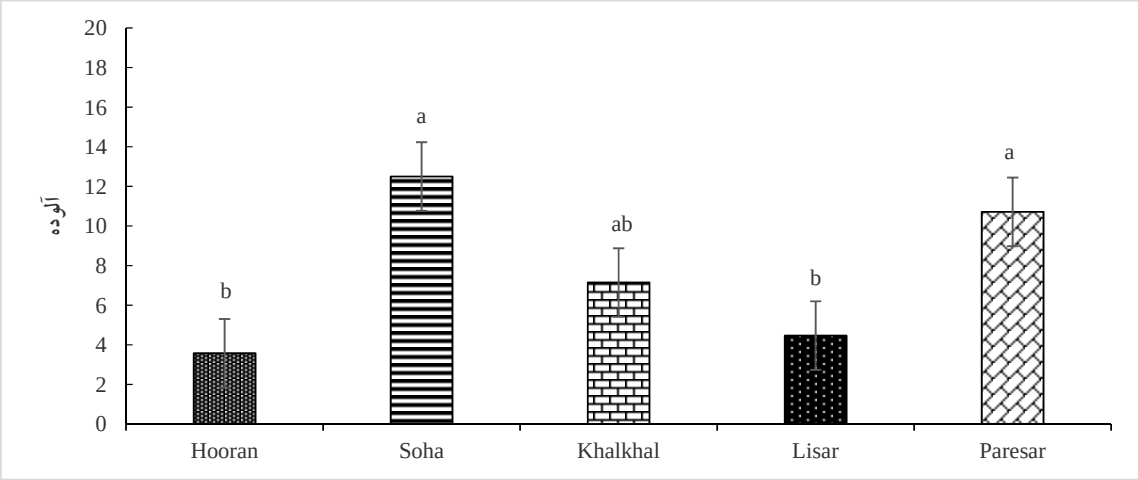
باتوجه به نتایج آزمایش اول از بین پنج اکوتیپ مورد بررسی لیسار بهترین عملکرد را از نظر ریزنمونه‌های سالم داشت. که ممکن است به‌دلیل کم‌تر آلوده بودن منطقه نمونه‌گیری باشد (شکل ۲). از عوامل مؤثر در آلودگی ریزنمونه‌ها منشأ ریزنمونه، روش جمع‌آوری ریزنمونه‌ها ، نوع بافت و مورفولوژی ریزنمونه‌ها می‌باشد. همچنین در بین تیمارهای ضدعفونی تیمارT_7 (الکل ۷۰ درصد + نانونقره ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بهترین عملکرد را در میزان ریز نمونه‌های سالم داشت که ممکن است بخاطر اثرات مخرب کمتر ناشی از استفاده از نانو نقره بر روی جوانه‌ها در مقایسه با کاربرد کلرید جیوه و هیپوکلریت سدیم باشد (شکل های ۳ و ۴).



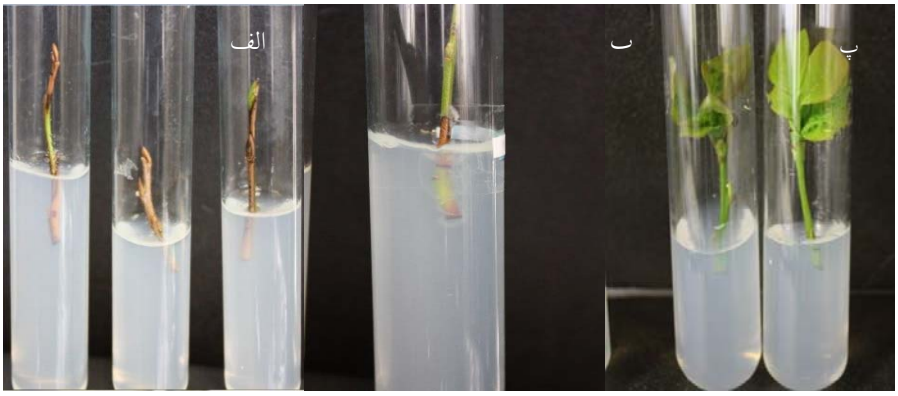
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل مناطق (حوران، سوها، خلخال، لیسار و پره‌سر) و تیمار بر ریزنمونه‌های سالم گیاه قره‌قاط



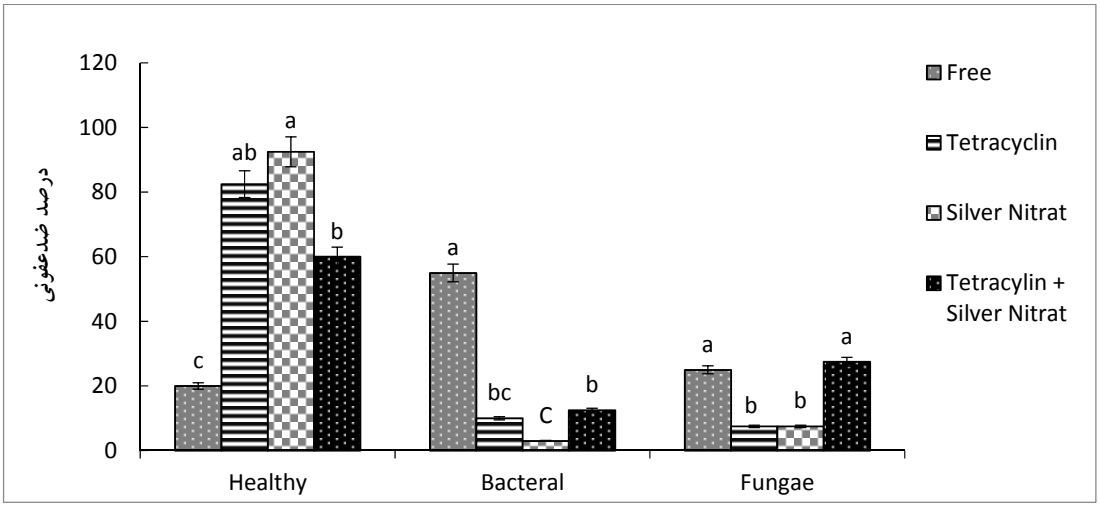
شکل۳- مقایسه میانگین اثر متقابل مناطق (حوران، سوها، خلخال، لیسار و پره‌سر) و تیمار بر ریزنمونه‌های سوخته گیاه قره‌قاط



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر مناطق (حوران، سوها، خلخال، لیسار و پره‌سر) بر ریزنمونه‌های آلوده گیاه قره‌قاط



شکل ۵-تأثیرpHهای مختلف هیپوکلریت سدیم بر روی درصدآلودگی و درصد قهوه‌ای شدگی و درصد رشد ریزنمونه‌های قره‌قاط در کشت درون-شیشه‌ای، الف: pH=۶/۵ ب: pH=۱۴ پ: pH=۹



شکل۶- تأثیر تیمارهای (نیترات نقره و تتراسایکلین) در ضد عفونی ریز نمونه‌های گیاه قره‌قاط

شکل۷- تأثیر تیمارهای (نیترات نقره و تتراسایکلین) در ضد عفونی ریز نمونه‌های گیاه قره‌قاط

تحت چنین شرایطی باید به دنبال ماده‌ای گشت که علاوه بر تأثیر مناسب روی آلودگی ریزنمونه‌ها، مخاطرات کمتری هم برای انسان و هم برای محیط‌زیست داشته باشد. کمترین مقدار آلودگی در ریزنمونه‌های استریل شده‌ی قره-قاط بمیزان ۴۳ درصد در تیمار کلرید جیوه ۰/۰۳ درصد بمدت دو دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر بدست آمد (۳). در مطالعه انجام گرفته روی گونه *R. nigrum* شستشوی ریزنمونه‌ها در آب جاری بمدت ۱/۵ تا ۲ ساعت و قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و سفیدکننده ۱۰ درصد بمدت ۱۰ دقیقه و در نهایت سه مرتبه شستشو در آب مقطر استریل بعنوان تیمار ضدعفونی مناسب برای این گونه معرفی شد (۲۵). در مورد قره‌قاط قرمز حذف برگ‌های توسعه یافته و فروبردن در محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱۵ درصد بمدت یک دقیقه که چند قطره محلول Tween 20 افزوده شده را بعنوان تیمار ضد عفونی مناسب معرفی کردند (۲۷). در گونه *magellanicumR.*. نیز استفاده از هیپوکلریت سدیم یک درصد کلر فعال که تنها ۱۲ درصد آلودگی داشتند و ۷۰ درصد ریزنمونه‌ها زنده ماندند (۱۰).

ضدعفونی ریزنمونه‌های گیاه *Citrus grandis* با استفاده از کلرید جیوه ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ درصد بمدت ۳ الی ۱۰ دقیقه ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها آلودگی قارچی را مشاهده گردید (۲۲). ولی در این آزمایش وقتی از کلریدجیوه استفاده گردید درصد آلودگی کمتری را نسبت به آزمایش راستگو مشاهده نمودیم که این امر نشان می‌دهد نوع ژنوتیپ هم روی درصد نمونه‌های سالم تأثیر به‌سزایی دارد. کلرید جیوه به طور گسترده برای کنترل آلودگی گیاهان چوبی استفاده شده است ولی این ماده بسیار سمی بوده و باید با دقت بالایی مورد استفاده قرارگیرد. چنین مواد شیمیایی نه‌تنها برای ریزنمونه بیش از حد سمی است برای محیط‌زیست نیز مخاطره آمیز است (۱۷).

در آزمایش دوم به بررسی تأثیر تغییرpH محلول ضدعفونی پرداخته شد به طور کلی تنظیم pH هیپوکلریت‌سدیم برای افزایش کارآیی ضدعفونی و کنترل آلودگی ریزنمونه‌های قره‌قاط در شرایط درون‌شیشه‌ای تأثیر معنی‌داری داشت. بطوری‌که استفاده از هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵ درصد بدون تنظیم pH (pH=۱۴) حتی به مدت ۱۵ دقیقه قادر به کنترل مؤثر آلودگی ریزنمونه‌های قره‌قاط نبود و در تیمار هیپوکلریت‌سدیم همراه با چند قطره Tween20 بدون تنظیم pH بمدت ۱۵ دقیقه بیشترین درصد آلودگی باکتریایی و قارچی بدست آمد. کمترین درصد آلودگی قارچی مربوط به تیمار ضدعفونی هیپوکلریت‌سدیم با pH=۶/۵ بود ولی از لحاظ درصد قهوه‌ای‌شدگی و سوختگی بیشترین درصد ریزنمونه‌ها را در برگرفت. از نظر درصد رشد ریزنمونه‌ها بهترین عملکرد در ریزنمونه-های سالم در ریزنمونه‌های مربوط به تیمار pH (۹ =pH) بدست آمده و با تغییر pH هیپوکلریت‌سدیم (۹ و

pH=۱۱/۵) درصد آلودگی نسبت به هیپوکلریت‌سدیم بدون تنظیم pH (pH=۱۴) کاهش نشان داد (شکل ۵). اثر تغییر pH محلول استریل کننده (هیپوکلریت‌سدیم) با غلظت‌های مختلف و مدت زمان متفاوت بر کنترل آلودگی درونی ریزنمونه‌های بافت گره *Eupatorium odoratum* بررسی گردید و نشان داده شد که پس از ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های گره با هیپوکلریت‌سدیم ۵٪ با pH= ۷ میزان آلودگی تا ۸۴ درصد در مقایسه با عدم تنظیم pH کاهش یافته است در آزمایش بعدی روی گره گیاه *Andrographis paniculata* با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم ۱۰ و ۲۰٪ بمدت ۲۰ دقیقه در ۷ و۱۲/۵=pH نیز بیان کردند که در pH= ۷ درصد آلودگی قارچی در مقایسه با pH=۱۲/۵ کمتر است (۱۹) که این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. به نظر می‌رسد که در اثر کاهش میزان pH هیپوکلریت‌سدیم، یون‌های OCl^- فعال بیشتری از ترکیبNaClO، آزاد شده و روی ساختار پمپ-های انتقال الکترون و سایر اندامک‌های حیاتی اثر می‌گذارد (۱۵). بنابراین با کاهشpH هیپوکلریت‌سدیم به pH=۶/۵، میزان یون‌های فعال بسیار زیاد بوده و در نتیجه علاوه بر، از بین بردن آلودگی سطحی و درونی ریزنمونه‌ها به خود سلول‌های ریزنمونه نیز آسیب جبران ناپذیری وارد کرده و آنها را نیز از بین می‌برد. بطوری‌که بخش عمده‌ای از ریزنمونه‌های قره‌قاط در تیمار ضدعفونی هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵ درصد با pH=۶/۵ قهوه‌ای شده و از بین رفتند. ولی به نظر می‌رسد که محلول هیپوکلریت‌سدیم با pH=۹ تعادل مناسبی از نظر یون‌های فعال Ocl^- ایجاد شده که علاوه‌بر کنترل مؤثر آلودگی قارچی و باکتریایی ریزنمونه‌های قره-قاط، زنده‌مانی و رشد آن‌ها را هم در مقایسه با هیپوکلریت‌سدیم بدون تنظیم pH کاهش نداده است.

در آزمایش سوم نیز به بررسی تأثیر نیترات نقره و تتراسایکلین در ضدعفونی ریز نمونه‌های قره قاط پرداخته شد (شکل ۶). با استفاده از نانونقره در ضدعفونی گیاه فندق نشان داده شد که تیمار نانو ذرات در کنترل آلودگی های ریزنمونه‌های فندق مؤثر بود اما غلظت‌های بالا باعث صدمات شدید به ریزنمونه می‌شود (۴). تیمار مختلف نانو ذرات نقره بیش‌ترین تأثیر را در کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی گیاه فندق داشتند. بهترین تیمار برای حذف آلودگی باکتریایی در این گیاه غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۲۰ دقیقه بود. بطوری که درصد آلودگی قارچی و باکتریایی ۸۳/۳۳ درصد کاهش یافت و ۶۶/۶۶ درصد ریزنمونه‌ها رشد کرده و شاخه تولید کردند (۹). اثرات نانوذرات‌نقره را بر کنترل آلودگی داخلی سنبل‌الطیب (*Valeriana afficinalis L.*) نشان داده شد این محققان بهترین تیمار برای رفع آلودگی سطحی ریزنمونه سنبل الطیب در محلول ۱۰۰ میلی‌گرم‌برلیتر نانو ذرات‌نقره به مدت ۶۰ دقیقه را گزارش نمودند. فروبردن ریزنمونه زیتون در نانو ذرات‌نقره پس از استریل سطحی نیز نشان داده که نانو ذرات‌نقره در کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی بسیار مؤثر است. با این‌حال، این روش قابل اجرا برای ریزنمونه-های زیتون به دلیل صدمات شدید نیست (۲۴). از لحاظ پایین بودن درصد سوختگی و آلودگی ریزنمونه‌ها با حمام آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در غلظت‌های ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت چهار ساعت و ۱۰۰میلی گرم در لیتر بمدت یک و چهار ساعت در گیاه انگور بدست آمد (۸). در این آزمایش بیشترین ریزنمونه‌های سالم مربوط به تیمار نیترات نقره بود. مکانیسم عمل ذرات نانونقره در از بین بردن میکروارگانیسم‌ها به وضوح شناخته نشده است. با این حال نشان داده شده است یون‌های مثبت نقره آزاد به آرامی می-تواند ساختار سلولی میکروارگانیسم ها را از بین برد. (۱۶). اثرات Ag^{++} روی میکرو ارگانیسم‌ها ممکن است بدلیل فعالیت در بخش Chemosmotic باشد. این محققان نشان دادند که یون‌های Ag^{++} از طریق تحت تأثیر قرار دادن فسفو لیپیدها، غشا سلولی میکروارگانیسم‌ها را نابود می-کنند. علاوه براین، یون های Ag^{++}ممکن است، جایگزین گروه گوگرد (-SH) در غشای سلول شده وسلول‌های میکروارگانیسم‌ها را نابود کند (۱۱). موقع استفاده از نانو

نقره سطح تماس با میکروب‌ها به‌مقدار زیادی افزایش یافته در نتیجه اثرات ضدمیکروبی آن تقویت می‌شود، اگر چه نحوه عمل نانو نقره روی میکروب‌ها بخوبی مشخص نشده ولی فرضیه‌هایی مبنی بر لیز شدن سلول و همچنین مهار رشد میکروب‌ها توسط نانو نقره پیشنهاد شده است (۲۰).

نتیجه کلی

به دلیل این که ریزنمونه‌های قره‌قاط از محیط بیرونی و جنگلی جمع‌آوری شدند و از آن جهت که ریزنمونه‌های مورد نظر از درصد آلودگی بالایی در محیط‌کشت برخوردار بودند. بنابراین اولویت اول این آزمایش استفاده از روش‌های مختلف ضدعفونی جهت از بین بردن بیماری‌های درونی بخصوص باکتری‌ها بود تا ریزنمونه-هایی با کمترین درصد آلودگی و با بیشترین درصد زنده-مانی و بیشترین پتانسیل رشد و در نهایت استقرار مطلوب به دست آید. بهترین پاسخ از نظر درصد آلودگی کمتر و درصد زنده‌مانی و رشد بیشتر مربوط به تیمار ضدعفونی ریزنمونه‌ای با الکل ۷۰ درصد+ نانوسیلور ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. تنظیم pH هیپوکلریت‌سدیم راهکار مناسبی برای رفع آلودگی ریزنمونه‌های قره‌قاط جهت کشت درون شیشه‌ای بود. بدین صورت که تغییر pH هیپوکلریت سدیم از۱۴ به ۹، درصد آلودگی را بسیار کاهش داد (صفر درصد) اما درصد زنده‌مانی را در pH=۶/۵ نیز بسیار کاهش داد در pH=۱۴ عملکرد بسیار ضعیفی از نظر رفع آلودگی درونی و زنده‌مانی ریزنمونه مشاهده شد. استفاده از تیمار نیترات‌نقره، تتراسایکلین و نیترات‌نقره+تتراسایکلین برای ضد عفونی ریزنمونه‌های قره‌قاط به‌عنوان بهترین تیمار ارزیابی شد به‌نحوی که میزان آلودگی باکتری با استفاده از نیترات‌نقره به صفر کاهش یافت.

سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و امتنان خود را از زحمات و تلاش انجام شده توسط مهندس حمیدرضا حیدری را در طی اجرای پروژه ابراز میدارند.

منابع

۱- اسدی، م.، ۱۳۷۶. فلور ایران، جهادسازندگی، شماره۲۳، ۲۹ صفحه.

۲- پارسا، م.، و زینالی، ا.، ۱۳۹۵. تأثیر الیسیتورهای جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات بر میزان تروپان آلکالوئیدهای آتروپین و اسکوپولامین در ریشه‌های مویین و ریشه‌های حاصل از کشت بافت گیاه *Hyoscyamus niger* L.، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۴، صفحات ۷۹۱-۷۷۸..

۳- درودی، ه.، و اکبری‌نیا، م.، ۱۳۹۴. ریزازدیادی گونه قره‌قاط (*Ribes khorasanicum*) از طریق کشت بافت، دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۲۳، شماره ۱، صفحات ۷۶-۶۵.

۴- دریانی، پ.، و زارع، ن.، ۱۳۹۴. تأثیر نانوذرات نقره بر کنترل آلودگی میکروبی و استقرار ریزنمونه‌های جوانه انتهایی و جانبی فندق در شرایط درون‌شیشه‌ای، اولین کنفرانس ملی نانو فناوری و کاربرد آن در کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

۵- فارسی، م.، ۱۳۸۵. اصول اصلاح نباتات، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، صفحات۲۳۴-۲۳۹.

۶- کیانی فریز، م.، زمانی، ذ.، عبادی، ع.، ۱۳۸۴. استقرار درون شیشه‌ای سه رقم زیتون، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، سال دوازدهم، شماره ۴، صفحات ۳۷-۲۹.

۷- گروسی، ق.، ملکی، س.، و نظامی آلانق، ا.، ۱۳۹۵. بهبود محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشدی در ریزازدیادی پایه رویشی پسته قزوینی، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۱، شماره۲، صفحات ۳۹۵-۳۸۳.

۸- گوران، ع.، مظفری، ع. ا.، و قادری، ن.، ۱۳۹۲. بررسی اثر ترکیبات مختلف ضد میکروبی روی ضد عفونی سطحی ریز نمونه‌های انگور *Vitis vinifera L.* در شرایط درون شیشه‌ای، هفتمین همایش یافته‌های پژوهشی کشاورزی – دانشگاه کردستان ۲۵و ۲۶ اردیبهشت.

9- Abdi, G., Salehi, H., and Khoush-Khoi, M., 2008. Nano silver, a novel Nano material for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis L.*) *tissue culture*, Acta Physiologia Plantarum, 30, PP: 709-714.

10- Arena, M. E., and Pastur, G. J. M., 1995. *In vitro* propagation of *Ribes magellanicum Poiret*. Scientia Horticulturae, 62, PP: 139–134.

11- Dibrov, P. J., Dzioba, K. K., and Gosink, C. C., 2002. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag^{+} in vibrio cholera, Antimicrob Agents chemother, 46, PP: 2668-2670.

12- Durkovic, J., 2008. Micropropagation of mature Cornus mas 'Macrocarpa', Trees, 22(4), PP: 597-602.

13- Habiba, V., Reza, S. H., Saha, M. L., and Rkhan, M., and Hadiuzzaman, S., 2002. Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana identification and prevention.plant Tissue calture, 12, PP: 117-124.

14- Harum, N., 2013. Surface sterilization procedures for leaves explants of rhododendron (*Rhododendron javanicum* (Blume) Benn) cultured *in vitro*, The Third Basic ScienceInternational Conference, B 21, PP: 1-4.

15- Leifert, C., Waites, W. M., and Nicholas, J. R., 1989. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. Journal Applied Microbiology, 67, PP: 353-361.

16- Lubick, N., 2008. Nanosilver toxicity. Ions, nano particlessor both. Environ, Sci Technol, 42, PP: 8617-8617.

17- Martino, K., 1990. Plant regeneration through somatic embryogenesis in medicinally important *Centella asiatica* L., In Vitro Cell, Development Biology Plant, 40, PP: 586-591.

18- Manole, C. G., Balan, V., Mencinicopschi, I. C., Golea, D., Rodino, S., and Butu, A., 2012. The influence of growth regulators concentrations on *in vitro* micro propagation of *Ribes rubrum*, Scientific Bulletin, Series, F., Biotechnologies. 16, PP: 26- 29.

19- Mitchell, S. A., Asemota, H. N., and Ahmad, M. H., 1995. Effects of explants source, culture medium strength, and growth regulators on the in vitro propagation of three Jamaican yams (*Dioscorea cayenensis, D. trifida* and *D. rotundata*), Journal Sciences Food Agriculture, 67: 173-180.

20- Prabhu, S., and Poulose, E. K., 2012. Silver nanoparticles, mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects.International Nano Letters a Springer open journal, PP: 2-10.

21- Pence, V. C., 2005. In vitro collecting, The effect of collecting method and antimicrobial agents on contamination in temperate and tropical collections. In Vitro Cell Development Biology Plant, 41, PP: 324-332.

22- Rastgoo, S., 2008. Studies on *in vitro* regeneration in pummel (*citrus grandis* L.) phD thesis, university of Agricultural Science, Banglore, India, PP: 101- 104.

23- Reed, B. M., and Abdelnour-Esquivel, A., 1991. The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium species* and cultivars. Horticultural Science, 26, PP: 1320-1322.

24- Rostami, A. A., and Shahsavar, A., 2009. Nano-silver particles eliminate the in vitro Contaminations of Oliver Mission Explant. Asian journal of plant Sciences, 8, PP: 505-509.

25- Ruzic, D., and Lazic, T., 2006. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. Agriculturae Conspectus Scientificus, 79, PP:149-153.

26- Sanders, J., Pithie, A., Ganly, P., Surgenor, L., Wilson, R., and Merriman, E., 2008. Aprospective double-blind randomized trial comparing intraluminal ethanol with91heparinized saline for the prevention of catheter-associated bloodstream infection in immune suppressed hematology patients. Juornal Antimicrob Chemother, 62, PP: 809–815.

27- Sedlak, J., and Paprstein, F., 2012. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars. Hort. Science (Prague), 39, PP: 21-25.

Investigation of different disinfection treatments on the explants of Cranberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.)

Rezazadeh B.,[1] Ghanbari A.,[1] Pourbeyrami Hir Y.[1] and Haghjooyan R.[2]

[1] Dept. of Horticulture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran.

[2] Horticultural Sciences Research institute, Karaj, I.R. of Iran.

Abstract

Cranberry which in Iran it is locally called as “Shihard” belongs to *Ericaceae* family. The fruit is spherical and spicy and it has high commercial value because of the presence of the anthocyanin, flavonoids, anticancer and antimicrobial compounds. The present research was conducted to investigate the disinfection methods of Cranberry in three different tests. The first experiment was to evaluate the disinfection of the explants of five different ecotypes including, Horan, Soha, Khalkhal (Ardebil), Lisar and Paresar (Gilan) Provice in Iran. The second experiment examines the effect of changing the pH of the disinfectant solution and the third experiment investigated the effects of tetracycline and silver nitrate on disinfection of cranberry explants In the first experiment, the Lisar ecotype was considered as the best ecotype for healthy samples, in the second experiment, pH = 9 was the best, and in the third experiment, silver nitrate had the highest percentage of healthy sputum samples. In general, many factors effects on disinfection of explants. The results of these experiments showed that type of ecotype, disinfectant materials and pH effects on disinfection of cranberry explants.

Key words: Anthocyanin, Ecotype, Flavonoid, Tetracycline, Silver nitrate