

اثرات پرسیدین، آکوا پرسیدین، پرسیدین پلاس و سوپر پرسیدین در کاهش آلودگی از محیط کشت مورد استفاده در کشت بافت شمشاد هیرکانی

اکرم احمدی*

ایران، گرگان، آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، بخش تحقیقات منابع طبیعی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳

چکیده

شمشاد هیرکانی (*Buxus hyrcana* Pojark) از جمله درختان رو به انقراض در جنگل‌های هیرکانی ایران است که در سالیان اخیر دستخوش آفت و بیماری در سطح گسترده شده است. با توجه به اهمیت این گونه و نیاز به کشت بافت آن یافتن روشی مناسب برای استریلیزاسیون ریزنمونه‌های این گونه جنگلی از ضروریات است. لذا، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات پرسیدین ۱۵٪، آکوا پرسیدین، پرسیدین پلاس و سوپر پرسیدین در کاهش آلودگی از محیط کشت در کشت بافت شمشاد جنگلی انجام پذیرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام گرفت (n=۴۵). ابتدا به منظور اعمال پیش تیمار، ریزنمونه‌ها (سرشاخه و بذر) با آب معمولی و چند قطره مایع ظرفشویی به مدت ۵ دقیقه به منظور حذف آلودگی‌های سطحی مورد شستشوی اولیه قرار گرفتند. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در قارچ‌کش بنومیل (۱٪) قرار داده شدند. بعد از آیشویی، در زیر هود استریل، استریلیزاسیون ریزنمونه‌ها به روش معمول (استفاده از اتانول ۹۶ درصد و هیپوکلریت سدیم (۳:۱) مخلوط با آب) و شستشو با آب مقطر سه بار به مدت ۱۰ دقیقه) انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل ماده ضدعفونی کننده (پرسیدین ۱۵٪، پرسیدین آکوا، سوپر پرسیدین، پرسیدین پلاس (در حجم‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر) در ترکیب با محیط کشت بودند. بعد از استریلیزاسیون ریزنمونه‌ها، مواد گیاهی بر روی محیط کشت موراشی و اسکوک در ترکیب با ضدعفونی کننده‌ها 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 تاریکی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج استعمال مواد ضدعفونی کننده در محیط کشت نشان داد که بدون توجه به نوع ریزنمونه میزان آلودگی بدین صورت بود: پرسیدین ۱۵٪ < پرسیدین پلاس < آکوا پرسیدین < سوپر پرسیدین. همچنین، نتایج نشان داد که میزان آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذر بود. نتایج مقایسات حجم‌های مختلف ضدعفونی کننده‌های مختلف در ریزنمونه سرشاخه و بذر نشان داد که در هر دو در حجم صفر یا تیمار شاهد، بیشترین میزان آلودگی مشاهده شد و کمترین آلودگی در حجم‌های مختلف سوپر پرسیدین اتفاق افتاد که میزان ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر کمترین میزان آلودگی بود ولی در ۶۰۰ میکرولیتر سوختگی نهال و خشکیدگی یا سوختگی بذر اتفاق افتاد. در خصوص استعمال مواد ضدعفونی کننده در مهار آلودگی از محیط کشت بافت شمشاد هیرکانی (هر دو ریزنمونه سرشاخه و بذر) سوپرپرسیدین می‌تواند گزینه مناسبی باشد.

واژه‌های کلیدی: شمشاد هیرکانی، استریلیزاسیون، محیط کشت، ریزنمونه، سوپر پرسیدین

* نویسنده مسئول، تلفن: اکرم احمدی، ۰۹۱۱۳۷۰۸۵۲۵، پست الکترونیکی: Ahmadi.1870@gmail.com

مقدمه

شمشاد خزری، شمشاد جنگلی یا شمشاد هیرکانی گونه‌ای دارد و بازمانده دوران سوم زمین‌شناسی است. برگ‌های آن به رنگ سبز تیره و براق است. شمشاد هیرکانی درختچه‌ای پهن برگ و همیشه سبز است که در جنگل‌های شمال رویش

کشت به چشم نمی‌خورد. حتی، در خصوص استریلیزاسیون ریزنمونه‌های شمشاد نیز مطالعه ای یافت نشد اما مروری بر مطالعات انجام گرفته در خصوص استریلیزاسیون با انواع محصولات پرسیدین، به شرح ذیل می‌باشد: میرعباسی لسکوکلایه و همکاران (۱۳۹۲) از ضدعفونی کننده پرسیدین در ضدعفونی جوانه‌های جانبی ملج *Ulmus glabra* استفاده کردند تا مقایسه اثر سطوح مختلف هورمون توپولین بر روی پرآوری ملج را مورد بررسی قرار دهند (۴). میرعباسی لسکوکلایه و همکاران (۱۳۹۱) مطالعه دیگری بر روی بهینه سازی کشت بافت ملج انجام دادند. ایشان در مرحله ضدعفونی ریزنمونه جوانه‌های جانبی و انتهایی از پرسیدین ۰/۱ درصد استفاده کردند که نتیجه تحقیقات ایشان نشان داد آلودگی به ۹ درصد کاهش یافت (۵).

نیک نژاد و همکاران (۲۰۱۱) ارزیابی درون شیشه‌ای ترکیبات با فعالیت ضد قارچی پراکسی استیک اسید (پرسیدین) بر روی یک گروه از قارچ‌ها انجام دادند. ایشان اثر غلظت‌های مختلف پراکسید استیک اسید (PAA) به عنوان پرسیدین و پرسیدین ۵۱۳ را بر روی میکروسپوروم گچ، کاندیدا آلبیکنس و اسپرژیلوس 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 و ۶۰ دقیقه تیمار قرار گرفتند. نتایج ایشان نشان داد که برای *C. albicans* و *M. gypseum* نتایج رضایت بخش با استفاده از ۱ و ۳ درصد پرسیدین پس از ۱۰ دقیقه بدست آمد. با این حال با بکارگیری پرسیدین ۵٪، هدف پس از ۳ دقیقه به دست آمد. از طرف دیگر، در مورد *A. niger* نتایج قابل قبولی پس از ۲۰ دقیقه برای پرسیدین ۳٪، ۱۰ دقیقه برای پرسیدین ۵ و ۱۰٪ و در نهایت ۵ دقیقه برای پرسیدین ۲۰٪ بدست آمد (۱۸). 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 به عنوان یک ضد عفونی کننده قابل

است که در جنگل‌های شمال و مناطق مناسب به ۵ - ۶ متر ارتفاع و گاه تا ۱۵ متر نیز می‌رسد. از جمله ذخیره‌گاه‌های شمشاد می‌توان به نمک آبرود، گرداب، خیوس، 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، شب‌خسب و ... همراه است. از پوشش گیاهی کف هم می‌توان به گونه‌های علفی نظیر سرخس و گرامینه و تعدادی از گونه‌های خزه‌های خاکزی یا دارچسب اشاره نمود (۳، ۸ و ۹).

گونه شمشاد کاربردهای دارویی و صنعتی بسیاری دارد (۹) که متأسفانه در سالیان اخیر بیماری بلایت و همچنین آفت شب پره شمشاد سبب آسیب جدی به این گونه باارزش و کمیاب شده‌اند (۳).

از جمله روش‌های بسیار متداول در تکثیر تجاری گونه‌ها استفاده از روش ریزازدیادی است که مزایای بسیاری نسبت به روش‌های معمول کشت بخصوص برای گونه‌های رو به انقراض دارد. لازم است در ریزازدیادی با استفاده از کشت درون شیشه‌ای، شرایط استریل برای کشت ریزنمونه‌ها فراهم گردد تا با به حداقل رساندن آلودگی، صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها صورت گیرد (۶).

وجود آلودگی‌ها در محیط کشت بر رشد گیاه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد. کشت بافت گیاهی روشی پرهزینه است، بنابراین برای کسب سود مطلوب باید کشت‌های عاری از آلودگی ایجاد شود (۲۰). استفاده از ضدعفونی کننده‌ها در ضدعفونی کردن سطح مهمترین مرحله در آماده سازی ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای است که در کنترل باکتری‌ها و قارچ‌ها موثر هستند (۱۷).

عموما در بسیاری از مطالعات جهت به حداقل رساندن آلودگی از روش استریلیزاسیون قبل از کشت بر روی ریزنمونه‌های گیاهی استفاده می‌شود و مطالعات چندانی در خصوص استفاده از ضدعفونی کننده‌ها در داخل محیط

مواد و روشها

نمونه‌برداری از گونه شمشاد از ذخیره‌گاه شمشاد هیرکانی چشمه بلبل، بندرگز انجام گرفت (شکل ۱). این ذخیره‌گاه جنگلی 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' ۳۶° تا ۴۵° ۴۷° شمالی) واقع شده است. نمونه‌ها پس از نمونه‌گیری، به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی انتقال یافت.

اطمینان برای استفاده در کاربردهای عمومی در نظر گرفته شود.

با توجه به اهمیت موضوع در خصوص استعمال مواد ضدعفونی‌کننده در محیط کشت بافت ریزنمونه‌های شمشاد هیرکانی و همچنین، اندک بودن مطالعات در خصوص محصولات پرسیدین، سوپر پرسیدین و پرسیدین آکوا ساخت شرکت بهبان شیمی مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات پرسیدین، آکوا پرسیدین، پرسیدین پلاس و سوپر پرسیدین در کاهش آلودگی از محیط کشت مورد استفاده در کشت بافت شمشاد هیرکانی انجام گرفت.



شکل ۱ - محل نمونه‌برداری واقع در ذخیره‌گاه شمشاد چشمه بلبل، استان گلستان

ماه و از سرشاخه‌های جوان انجام گرفت. برای تهیه ریزنمونه ابتدا بذرها از داخل کپسول جدا شده و سرشاخه‌ها نیز به قطعات ۲-۳ سانتی‌متری برش داده شد. سه پایه درختی بطور 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 سپس به مدت ۱۰ دقیقه در قارچ‌کش بنومیل (۱٪) قرار گرفتند. بعد از آبشویی، در زیر هود استریل، استریلیزاسیون ریزنمونه‌ها با روش معمول شامل استفاده از اتانول ۹۶ درصد و هیپوکلریت سدیم (۱، ۲،

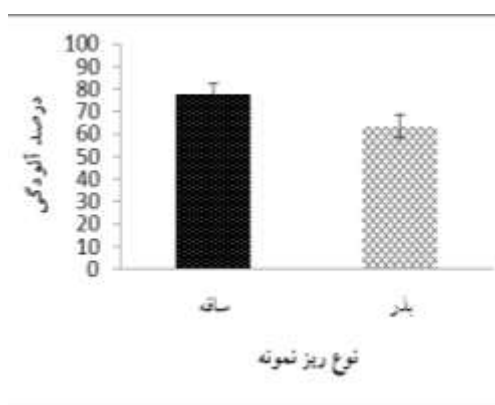
در این پژوهش گونه مورد مطالعه، شمشاد هیرکانی یا خزری بود (شکل ۲). محصولات مورد استفاده در این تحقیق شامل سوپرپرسیدین، پرسیدین ۱۵٪، پرسیدین پلاس و پرسیدین آکوا بود. محصول پرسیدین ۱۵٪ حاوی ۱۵٪ پراستیک اسید، سوپر پرسیدین حاوی ۲۲٪ پراستیک اسید و پرسیدین آکوا نیز حاوی ۴۶٪ آب اکسیژنه و ۰/۰۷ درصد نیترات نقره بود که با حجم‌های (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر) در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند.

نمونه‌برداری بصورت سرشاخه و بذر از گونه شمشاد هیرکانی انجام گرفت (شکل ۳). نمونه‌برداری در اردیبهشت

کننده در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای مورد اندازه‌گیری شامل درصد آلودگی در ریزنمونه‌های مختلف (سرشاخه و بذر) همچنین در مواد ضدعفونی کننده مختلف و همچنین در حجم‌های مختلف بود.

نتایج

نتایج بررسی نرمالیت داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بر روی باقی‌مانده‌های مدل حاکی از نرمال بودن داده‌ها بود ($P \geq 0.05$). در ابتدا آزمون تی مستقل بر روی داده‌های حاصل از دو ریزنمونه سرشاخه و بذر انجام گرفت. نتایج نشان داد که میزان آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذر بود ($T=2.170$, $P \leq 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲ - نتایج آزمون تی مستقل بر روی داده‌های حاصل از دو ریزنمونه سرشاخه و بذر

جدول ۲، نتایج آنالیز واریانس داده‌ها را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از معنی‌دار بودن پارامترهای نوع ریزنمونه، نوع ضدعفونی کننده و حجم ضدعفونی کننده بود ($P \leq 0.01$). همچنین، نتایج نشان داد که اثرات متقابل معنی‌داری بین نوع ریزنمونه \times ماده ضدعفونی کننده، بین نوع ریزنمونه \times حجم ضدعفونی کننده ($P \leq 0.01$) و همچنین، بین نوع ریزنمونه \times ماده ضدعفونی کننده \times حجم ضدعفونی کننده وجود داشت ($P \leq 0.05$).

و ۴ درصد) و شستشو با آب مقطر سه بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. بعد از استریلیزاسیون ریزنمونه‌ها، مواد گیاهی بر روی محیط کشت موراشی و اسکوگ قرار گرفتند که حاوی حجم‌های مختلفی از محصولات ضدعفونی کننده بودند (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر) (جدول ۱). در این روش، مواد ضدعفونی کننده پرسیدین ۱۵٪، پرسیدین آکوا، سوپر پرسیدین و پرسیدین پلاس در دوزهای مختلف به محیط کشت MS بعد از رسیدن به دمای ۵۰ درجه با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرولیتر افزوده شد و سپس، ریزنمونه‌ها به روش معمول استریل شده و در محیط‌های کشت قرار داده شد.

جدول ۱- ترکیب انواع حجم‌های مختلف ضدعفونی کننده با محیط کشت در کاهش آلودگی از ریزنمونه‌های شمشاد هیرکانی

ردیف	تیمارهای ضدعفونی
۱	محیط کشت MS+ پرسیدین ۱۵٪ (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)
۲	محیط کشت MS+ پرسیدین آکوا (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)
۳	محیط کشت MS+ سوپر پرسیدین (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)
۴	محیط کشت MS+ پرسیدین پلاس (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)

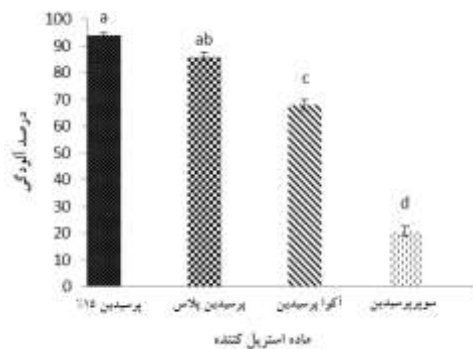
برای اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در شرایط رشدی با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بررسی آلودگی (آماربرداری) بصورت هفتگی انجام گرفت و تا یک ماه ادامه داشت. در پایان، آلودگی‌های قارچی و باکتریایی مورد شناسایی قرار گرفت.

طرح آزمایشات تحقیق بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی است. تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم افزار 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 حجم استریل

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس کل داده‌ها در محیط کشت در ترکیب با ضدعفونی کننده‌های پرسیدین ۱۵٪، سوپر پرسیدین، آکواپرسیدین و پرسیدین پلاس

منبع تغییرات	مجموع مربعات درجه آزادی میانگین مربعات	میزان F	معنی داری
ریز نمونه	۱	۱۱۰/۵۱۰	۰/۰۰۰
ماده استریل کننده	۳	۹۹۸/۷۸۱	۰/۰۰۰
حجم ضدعفونی کننده	۳	۵۷۸/۴۴۸	۰/۰۰۰
ریز نمونه × ماده ضدعفونی کننده	۳	۷۷/۲۸۱	۰/۰۰۰
ریز نمونه × حجم ماده ضدعفونی کنند	۳	۳۰/۴۴۸	۰/۰۰۱
ماده ضدعفونی کننده × حجم ماده ضدعفونی کننده	۹	۳۸۱/۰۹۴	۰/۰۰۰
ریز نمونه × ماده ضدعفونی کننده × حجم ماده ضدعفونی کننده	۹	۳۶/۲۶۰	۰/۰۱۸
خطا	۶۴	۱۰۴/۶۶۷	۱/۶۳۵
کل	۹۶	۱۳۰۴۹/۰۰۰	

و پرسیدین ۱۵٪ در ریز نمونه سرشاخه در شکل (۵) قابل مشاهده است.



شکل ۳- مقایسه میانگین داده‌ها در استریل کننده‌های مختلف بدون توجه به نوع ریز نمونه بدون احتساب شاهد در هر تیمار

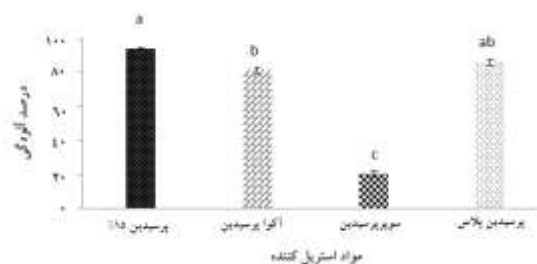
مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که در ضدعفونی کننده‌های مختلف بدون توجه به نوع ریز نمونه بدون احتساب شاهد در هر تیمار، میزان آلودگی بصورت ذیل بود: پرسیدین ۱۵٪ < پرسیدین پلاس < آکوا پرسیدین < سوپر پرسیدین (شکل ۳).

مقایسه اثرات تیمارهای مرکب ماده استریل کننده و حجم‌های مختلف آنها در آلودگی ریز نمونه سرشاخه: مقایسه اثرات ضدعفونی کننده‌های مختلف در ریز نمونه سرشاخه حاکی از آن بود که پرسیدین ۱۵٪ بیشترین درصد آلودگی را نشان داد و کمترین میزان آلودگی در ماده استریل کننده سوپر پرسیدین مشاهده شد (شکل ۴). میزان آلودگی در شرایط کنترل و رفع آلودگی تحت تیمار سوپر پرسیدین

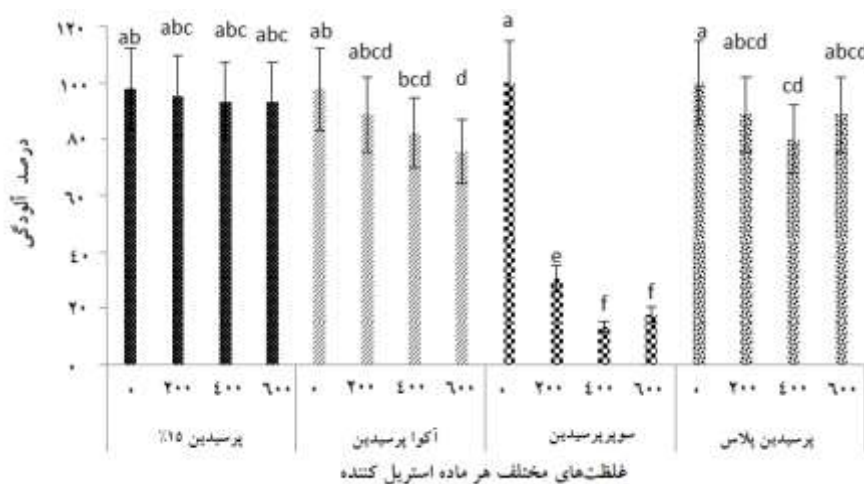


شکل ۴- مقایسه اثرات ضدعفونی کننده‌های مختلف در ریز نمونه سرشاخه

نتایج مقایسات میانگین دانکن نشان داد که در حجم صفر یا تیمار شاهد بیشترین میزان آلودگی مشاهده شد و کمترین آلودگی در حجم‌های مختلف سوپر پرسیدین اتفاق افتاد که میزان ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر کمترین میزان آلودگی بود اما در ۶۰۰ میکرولیتر سوختگی نهال اتفاق افتاد (شکل ۶).

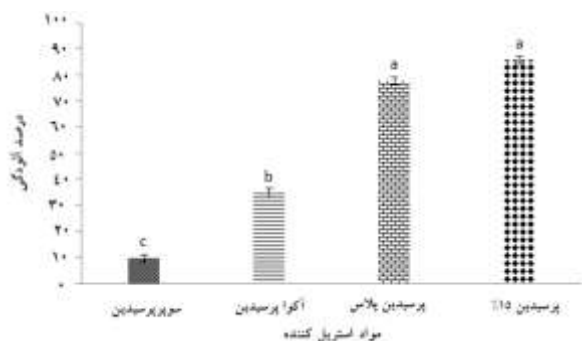


شکل ۵- میزان آلودگی تحت تیمارهای مختلف: الف) سوپر پرسیدین، ب) پرسیدین ۱۵٪ و ج) کنترل



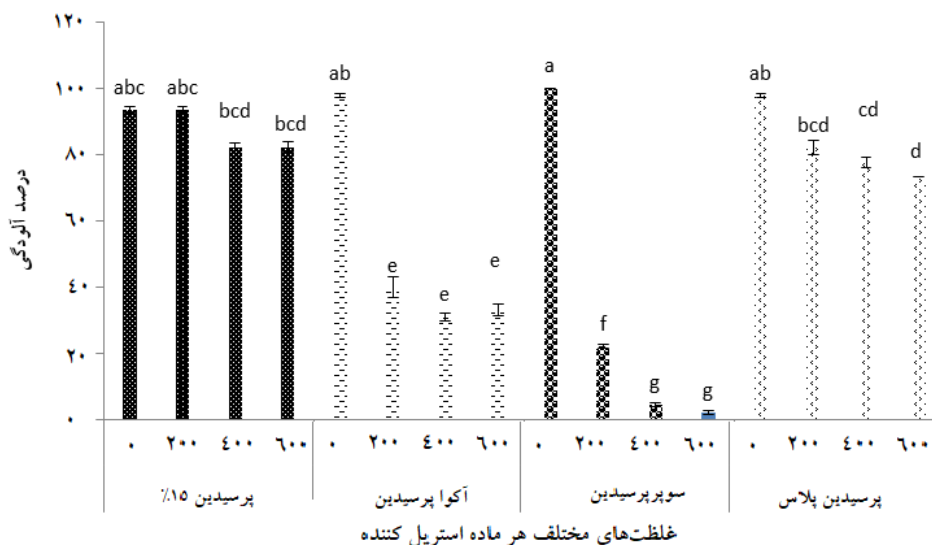
شکل ۶- مقایسه تیمارهای مرکب ماده استریل کننده در حجم‌های مختلف (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر) در ریزنمونه سرشاخه

مقایسه اثرات تیمارهای مرکب ماده استریل کننده و حجم‌های مختلف آنها در آلودگی ریز نمونه بذر: مقایسه اثرات ضد عفونی کننده‌های مختلف در ریز نمونه بذر نتایج حاکی از آن بود که بیشترین درصد آلودگی در پرسیدین ۱۵٪ و پرسیدین پلاس مشاهده شد و کمترین میزان آلودگی در ماده استریل کننده سوپر پرسیدین مشاهده شد (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه اثرات ضد عفونی کننده‌های مختلف در ریزنمونه بذر

نتایج بررسی تیمارهای مرکب نشان داد که در حجم صفر یا تیمار شاهد بیشترین میزان آلودگی مشاهده شد و کمترین آلودگی در حجم‌های مختلف سوپر پرسیدین اتفاق افتاد که میزان ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر کمترین میزان آلودگی بود (شکل ۸) ولی در ۶۰۰ میکرولیتر سوختگی نهال اتفاق افتاد (شکل ۹).



شکل ۸- تیمارهای مرکب انواع استریل کننده‌های مورد استفاده در حجم‌های مختلف (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر) در ریزنمونه بذر

بحث و نتیجه گیری

پراستیک اسید (PAA) محصول زیستی قابل تجزیه با خاصیت قارچ کشی و باکتری کشی بسیار موثری است که در برابر طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها قابل استفاده است (۱۴). پراستیک اسید یک اسید آلی است که از واکنش اسید استیک و پراکسید هیدروژن ایجاد می‌شود (۱۰). بطور کلی، سال‌ها است که خواص ضد میکروبی ترکیبات پراکسید هیدروژن شناخته شده است و کاربردهای گوناگونی دارد که به عنوان ضد عفونی کننده (۱۲) و اسپورکش استفاده می‌شود و براساس گزارشات، پراستیک اسید یکی از موثرترین مواد زیست کش است که هم در محلول آبی و هم به عنوان آئروسول یا بخار استفاده می‌شود (۱۳). این ماده حتی به عنوان ترکیب آنتی وایرال نیز پیشنهاد شده است (۱۵). در تحقیق حاضر نیز محصولات مختلف پرسیدین، سوپر پرسیدین، آکواپرسیدین و پرسیدین پلاس به عنوان ماده ضد عفونی کننده قابل استفاده در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد پارامترهای نوع ریزنمونه، نوع ضد عفونی کننده و حجم ضد عفونی کننده‌ها در کنترل و مهار آلودگی‌ها موثر بودند. اگر چه نوع گونه، نوع ریزنمونه، سن، فصل



شکل ۹- سوختگی نهال در ۶۰۰ میکرولیتر سوپر پرسیدین در محیط کشت

شناسایی عوامل بیماری‌زا در محیط‌های کشت با ضد عفونی کننده‌های مختلف در حجم‌های متفاوت: در این آزمایش، تشخیص آلودگی‌های قارچی و باکتریایی بصورت مورفولوژیکی و با استفاده از کلیدهای شناسایی انجام گرفت. به طور کلی، منبع اصلی آلودگی در مطالعه حاضر منشا قارچی مشاهده شد (۹۹٪) و آلودگی باکتریایی (۱٪) بود. در آلودگی‌های حاصله جنس‌های *Penicillium sp.*، *Alternaria sp.*، *Fusarium sp.*، *Cladosporium sp.*، *Botrytis sp.* شناسایی شدند. تشخیص آلودگی‌های باکتریایی انجام گرفته حاکی از شناسایی باکتری جنس *Bacillus sp.* در محیط‌های کشت بود.

نتیجه ربانی نسب (۱۴۰۰) است که در تحقیق ایشان سوپرپرسیدین ۴۰۰ میکرولیتر در محیط کشت PDA توانست بطور معنی‌داری قارچ‌های *Geotrichum candidum* و *Penicillium digitatum* را کنترل کند (۱).

مقایسه اثرات ضدعفونی‌کننده‌های مختلف در ریز نمونه بذر نشان داد که بیشترین درصد آلودگی در پرسیدین ۱۵٪ و پرسیدین پلاس مشاهده شد و کمترین میزان آلودگی در ماده استریل‌کننده سوپرپرسیدین مشاهده شد. مکانیسم عمل پراستیک اسید به عنوان ماده اصلی استریل‌کننده در سوپرپرسیدین بدین صورت است که این ماده قادر به تخریب انواع ماکرومولکول‌ها شامل کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و اسیدهای آمینه بوده و با لیز سلولی باعث مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شود. پرسیدین از طریق اکسیداسیون غشای خارجی سلول‌های رویشی باکتری، اندوسپور، مخمرها و هاگ قارچ‌ها باعث مرگ عوامل فوق‌شده و محیط را ضدعفونی می‌کند. این ماده با واکنش با پروتئین‌ها و آنزیم‌های سلولی به روشی مشابه سایر عوامل اکسیدکننده عمل می‌کند (۱۴).

نتایج بررسی تیمارهای مرکب نشان داد که در حجم صفر یا تیمار شاهد بیشترین میزان آلودگی مشاهده شد و کمترین آلودگی در حجم‌های مختلف سوپر پرسیدین اتفاق افتاد که میزان ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر کمترین میزان آلودگی بود ولی در ۶۰۰ میکرولیتر اثرات خشکیدگی یا سوختگی بر روی سطح بذر مشاهده شد. مواد موثره در ماده استریل‌کننده 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. طبق ISIR (پروتکل ۶۹۸۶ موسسه استانداردها و تحقیقات صنعتی ایران)، PAA به دلیل قدرت بالایی در کاهش شدت جمعیت میکروبی خصوصاً در مهمترین گونه‌های قارچی دارد (۱۸). اگرچه در بسیاری از پژوهش‌ها استفاده از

نمونه‌برداری و شرایط آب و هوایی بر آلودگی در ریزنمونه‌ها اثر می‌گذارد (۲۱) ولی در هر صورت ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده از اکوسیستم‌های طبیعی آلودگی‌های سطحی بسیاری دارند و کنترل آلودگی‌های آن از جمله چالش‌های بزرگ و مهم در کشت بافت گیاهی است که معمولاً زمانبر و پرهزینه است (۱۱). همچنین، نتایج نشان داد که میزان آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذر بود که بر لزوم استریل ریزنمونه‌ها قبل از کشت صحنه گذاشت که مشابه نتایج سعیدی حیدری و صفرنژاد (۱۳۹۴) بود (۲). از جمله دلایل بروز آلودگی بیشتر در ریزنمونه‌های سرشاخه در مقایسه با بذر می‌توان به بافت ریزنمونه و همچنین، مدت تماس بیشتر ریزنمونه‌ها با محیط اشاره نمود (۷). نتایج این پژوهش نشان داد که بذور جمع‌آوری شده از رویشگاه طبیعی آلوده بودند و قادر به جوانه‌زنی در شرایط درون شیشه‌ای نبودند. در رویشگاه طبیعی به علت وجود رقابت، شرایط آب و هوایی و رویشگاه و انتخاب طبیعی، زادآوری تحت تاثیر قرار می‌گیرد بطوریکه سبب در خطر انقراض قرار گرفتن این گونه با ارزش جنگلی شده است. مقایسه ضدعفونی‌کننده‌های مختلف بدون توجه به نوع ریزنمونه بدون احتساب شاهد در هر تیمار نشان داد میزان آلودگی بدین صورت بود: پرسیدین ۱۵٪ < پرسیدین پلاس < آکوا پرسیدین < سوپر پرسیدین.

نتایج مقایسات حجم‌های مختلف ضدعفونی‌کننده‌های مختلف در ریزنمونه سرشاخه نشان داد که در حجم صفر یا شاهد، بیشترین میزان آلودگی مشاهده شد و کمترین آلودگی در حجم‌های مختلف سوپر پرسیدین اتفاق افتاد که میزان ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر کمترین میزان آلودگی بود ولی در ۶۰۰ میکرولیتر سوختگی نهال اتفاق افتاد که سرشاخه را دچار سوختگی نمود و زنده‌مانی ریزنمونه را تحت تاثیر قرار داد که احتمالاً به دلیل افزایش میزان ماده موثره استریل‌کننده می‌باشد. لذا دوز مناسب جهت استعمال در محیط کشت جهت کنترل آلودگی ریزنمونه سرشاخه در گونه شمشاد هیرکانی ۴۰۰ میکرولیتر معرفی می‌گردد که مشابه

یافتن روش و ماده ضدعفونی کننده مناسب برای کشت بافت هر گونه گیاهی قبل از انجام آزمایشات علمی و بویژه ریزازدیادی و تکثیر تجاری آنها از اهمیت بسیاری در دنیا برخوردار است. از آنجایی که عموماً مواد استریل کننده قبل از کشت و بر روی ریزنمونه‌ها اعمال می‌شود استفاده از این مواد در محیط کشت نیز می‌تواند آلودگی را تا حد بسیار زیادی کاهش دهد. در خصوص استعمال مواد ضدعفونی کننده مورد استفاده در این تحقیق، ماده سوپراکسیدین می‌تواند به عنوان یک ضدعفونی کننده با عملکرد مناسب در کاهش آلودگی‌های قارچی و باکتریایی محیط کشت مورد استفاده برای کشت گونه شمشاد هیرکانی قرار گیرد. پیشنهاد می‌گردد این ماده برای دیگر گونه‌های جنگلی نیز مورد آزمون قرار گیرد.

سیاسگزاری

لازم است از مدیریت محترم شرکت بهبان شیمی جناب آقای کرجالیان و همچنین سرکار خانم دکتر کاویان و خانم دکتر حاتم زاده 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.

پرسیدین (پراکسی استیک اسید) حتی در درصدهای پایین نیز موثر بوده است (۴) ولی در خصوص گونه جنگلی شمشاد بدلیل آلودگی بسیار در اکوسیستم جنگلی این استریل کننده کارایی چندانی نداشت ولی سوپراکسیدین با داشتن مواد موثره‌ای همچون پراکسی استیک اسید، حاوی هیدروژن پراکساید و اسید استیک گلاسیال کارایی بالاتری را در مهار آلودگی‌ها در محیط نشان داد. اما در استفاده از این ترکیبات توجه به دز مصرفی بسیار مهم است چرا که ممکن است علاوه بر سرکوب عامل بیماریزا سبب آسیب جدی به گیاه شود (۱۹).

در پژوهش حاضر، قارچ‌های *Penicillium sp.*، *Alternaria sp.*، *Fusarium sp.*، *Cladosporium sp.* و *Botrytis sp.* و باکتری *Bacillus sp.* مشاهده شد که از جمله آلودگی‌های معمول در محیط کشت‌ها هستند (۱۸). در مطالعات انجام گرفته، چندین مطالعه فعالیت ضد قارچی ترکیبات حاوی PAA را علیه *Penicillium digitatum* و *Rhizopus* و *Botrytis cinerea* و *Monilinia laxa* و *stolonifer* و بسیاری از عوامل بیماریزا دیگر گزارش کرده است. همچنین قدرت ضدباکتریایی پراکسی استیک اسید بر روی باکتری‌های سودوموناس، انتروکوک و استافیلوکوک در زمینه پزشکی گزارش شده است (۱۶). 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 به همراه داشته باشد.

منابع

۱. ربانی نسب، ح.، (۱۴۰۰). بررسی کارایی بررسی کارایی آگریسیدین، اگرسیسیدین، اگرسیسیدین S، اگرسیسیدین P و اگرسیسیدین A در کنترل بیماری‌های پس از برداشت مرکبات. طرح خاتمه یافته. سازمان جهاد کشاورزی استان گلستان.
۲. سعیدی حیدری، الف.، صفرنژاد، ع.، (۱۳۹۴). تکثیر افراکیکم (*Acer monosperulatum*) از طریق کشت بافت. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۳(۲): ۲۳۷-۲۴۶.
۳. فراهانی، س.، رسول، الف.، صالحی، م.، عارفی پور، م.، (۱۳۹۵). گزارش آفت جدید، *Cydalis perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae) 1859 از ایران. تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران. ۱۴(۱): ۶۸-۷۲.

۴. میرعباسی لسکوکلایه، س. م.، و حسین پور، ب.، (۱۳۹۱). مقایسه اثر سطوح مختلف هورمون توپولین بر روی پر آوری نارون ملج *Ulmus glabra*، اولین کنفرانس ملی راه کارهای دستیابی به توسعه پایدار (کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست)، تهران.
۵. میرعباسی لسکوکلایه، س. م.، حسین پور، ب.، قائم مقامی، ع.، ابراهیمی، آ.، (۱۳۹۱). بهینه‌سازی کشت بافت ملج، سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی)، مشهد.
۶. قاسمی بزدی، ک.، احمدی، الف.، (۱۳۸۷). بیوتکنولوژی سلول و بافت، انتشارات مخدومقلی فراغی. ۲۵۴ صفحه.
۷. محمدزاده، الف.، پیام نور و.، کاوسی، م. ر.، (۱۳۹۸). ارزیابی نوع ریزنمونه و فصل نمونه‌گیری تحت تأثیر تیمارهای مختلف ضدعفونی به منظور کشت بافت شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.). فصلنامه علمی پژوهش و توسعه جنگل. ۵۴۰-۵۲۷: (۴)۵.
۸. پوربابایی، ح.، عابدی، ط.، (۱۳۸۷). بررسی ساختار توده و تنوع زیستی گونه‌های گیاهی در رویشگاه شمشاد، کیشخانه، تالش، گیلان. مجله پژوهش و سازندگی در منابع، شماره ۸۰.
۹. رجایی، الف.، گرایلی، ش.، حسینی نصر، س. م.، (۲۰۱۳). بررسی وضعیت اکولوژیکی، حفاظتی و اقتصادی گونه جنگلی شمشاد. سومین کنفرانس بین‌المللی برنامه ریزی و مدیریت محیط زیست.
10. Alvaro J.E. Moreno S. Diane F. Santos M. Carrasco G. Urrestarazua M. (2009). Effects of peracetic acid disinfectant on the postharvest of some fresh vegetables, Journal of Food Engineering. 95:11-15.
11. Daud NH. Jayaraman Sh. Mohamed R. (2012). An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 20(2):55-58.
12. Gump W. (1979). Disinfectants and antiseptics. In KirkOthmer Encyclopedia of Chemical/Technology 3rd edition volume 7 ed. Grayson, M. p. 807. New York: John Wiley and Sons.
13. Doll JP. Trexler PhC. Reynolds LI. Bernard GR. (1963). The Use of Peracetic Acid to Obtain Germfree Invertebrate Eggs for Gnotobiotic Studies. The American Midland Naturalist. 69(1):231-239.
14. Kitis M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review, Environ. Int. 30: 47-55.
15. Kline LB. Hull RN. (1960). The virucidal properties of peracetic acid. American Journal of Clinical Pathology. 33:3&33.
16. Mari M. Gregori R. Donati I. (2004). Postharvest control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by peracetic acid, Postharvest Biol. Tec. 33: 319-325.
17. Mihaljevic I. Dugalic K. Tomas V. Viljevac M. Pranjic A. et al. (2013). *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of oblacinska sour cherry. J. Agric. Sci. 58:117-126.
18. Niknejad F. Morady MS. Keshtkar AA. Joshaghani HR. 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).
19. Pedersen LF. Jokumsen A. Larsen VJ. Henriksen NH. (2015). Peracetic acid products expand sanitizing, organic water treatment options, Glob. Aquac. Advocate: 66-67.
20. Ray SS. Ali N. (2017). Biotic Contamination and Possible Ways of Sterilization: A Review with Reference to Bamboo Micropropagation. Braz. Arch. Biol. Technol. v.59: e160485.
21. Read PE. Preece JE. (2014). Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. In: Neal Van Alfen, editor-in-chief. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 2:317-336.

Effects of Percidine, Aqua Percidine, Percidine Plus and Super Percidine on reducing contamination from culture medium used in *Buxus hyrcana* Pojark tissue culture

Ahmadi A.

Research Section of Natural Resources, Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan Province, Research Organization, Agricultural Education and Promotion, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

Buxus hyrcana Pojark is one of the endangered trees in the Hyrcanian forests of Iran, which has been faced by pests and diseases in recent years. Due to the importance of this species and the need to its tissue culture, finding a suitable method for sterilization of explants of this forest species is essential. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of Percidine, Aqua Percidine, Percidine Plus and Super Percidine in reducing pollution from the culture medium in forest boxwood tissue culture contamination from culture medium used in *Buxus hyrcana* tissue culture. The experiment was performed in a completely randomized design with 3 replications (n=45). First, for pre-treatment, explants (twigs and seeds) were washed with ordinary water and a few drops of dishwashing liquid for 5 minutes to remove surface contaminants. Then, they were placed in benomyl fungicide (1%) for 10 minutes. After washing, under sterile hood, sterilization of explants was performed through usual method (using ethanol 96% and sodium hypochlorite (1:3 mixed with water) and washing with distilled water three times for 10 minutes). Experimental treatments included disinfectant (Percidine 15%, Aqua Percidine, Super Percidine, Percidine Plus (at concentrations of 200, 400 and 600 μ l) in combination with the culture medium. After sterilization of explants, plant materials were cultured on Murashige and Skoog media in combination with disinfectants. To measure contamination, cultures were examined under growing conditions at 25 ± 1 °C with a light intensity of 1000 to 1500 lux, 16 hours of light and 8 hours of darkness. The results of using disinfectants in the culture medium showed that regardless of the type of explant, the contamination rate was as follows: Percidine 15% > Percidine Plus > Aqua Percidine > Super Percidine. Also, the results showed that the rate of infection was higher in the twig explant than in the seed explant. The results of comparing different concentrations of different disinfectants in twig and seed explants showed that the highest level of contamination was observed in both zero or control concentrations. Also, the lowest contamination occurred at different concentrations of super Percidine that 400 and 600 μ l was the lowest level of contamination, but seedlings were burned and seeds withered or burned at 600 μ l. Regarding the use of disinfectants in inhibiting contamination in *Buxus hyrcana* tissue culture (both twig and seed explants), super Percidine can be a good option.

Key words: *Buxus hyrcana*, Sterilization, Culture medium, Explant, Super Percidine