فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۵، شماره ۴، صفحه ۵۴۰-۵۲۷، (۱۳۹۸)

ارزیابی نوع ریزنمونه و فصل نمونه‌گیری تحت تأثیر تیمارهای مختلف ضدعفونی به‌منظور کشت بافت شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.)

الله‌وردی محمدزاده[۱]، وحیده پیام نور[*۲] و محمدرضا کاوسی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. (ecology2020@yahoo.com)
۲- دانشیار گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. (mnoori56@gmail.com)
۳- دانشیار گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. (kavosi.reza66@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۱۱

چکیده

این پژوهش با هدف یافتن بهترین ریزنمونه و فصل نمونه‌برداری تحت تأثیر تیمارهای مختلف سترون-سازی برای دست‌یابی به دستورالعمل مناسب و بهینه برای پژوهش‌های کشت بافت شمشاد خزری انجام شد. ریزنمونه‌های برگ و ساقه از بخش‌های مختلف گیاه تهیه شدند. ابتدا پیش‌تیمارهای ضدعفونی ریزنمونه‌ها و شستشوی اولیه با آب معمولی دارای چند قطره مایع ظرف‌شویی به‌مدت چهار تا پنج دقیقه به‌منظور حذف آلودگی‌های سطحی انجام شد. سپس در زیر هود استریل سترون‌سازی با استفاده از ۱۳ تیمار مختلف انجام شده و بعد از اعمال هر تیمار، پنج بار با آب مقطر استریل آبشویی و در پایان ریزنمونه‌های مناسب از مواد گیاهی جدا و روی محیط کشت PDA در داخل پتری‌های استریل در کنار شعله قرار داده شدند. برای اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در اتاق رشد با دمایی معادل ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس و تاریکی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد ریزنمونه‌های فصل بهار نسبت به ریزنمونه‌های فصل پاییز دارای آلودگی میکروبی کمتری هستند. از طرفی ریزنمونه‌های برگی نسبت به ریزنمونه‌های ساقه درصد آلودگی کمتری از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: بیماری بلایت شمشاد، تیمار ضدعفونی، شمشاد خزری، کشت بافت.

---

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۹۱۱۳۷۳۵۸۱۲

مقدمه

خانواده شمشاد (*Buxaceae*) شامل درختان، درختچه‌ها و گیاهان همیشه‌سبز است. این خانواده دارای پنج جنس شامل: *Buxus*، *Noto buxus*، *Sarcococca*، *Pachysandra* و *Styloceras* است (Van Laere *et al*., 2015). بزرگ‌ترین جنس این خانواده *Buxus* است که پژوهش‌های تاکسونومیکی اخیر نشان می‌دهد این جنس بین ۹۵ تا ۱۰۰ گونه دارد (Larson, 1999; Van Laere *et al*., 2015). شمشاد خزری (*Buxus hyrcana Pojark.*) یکی از معدود درختان پهن‌برگ همیشه‌سبز جنگل‌های خزری است که دیرزیستی بالایی (بالغ بر ۵۰۰ سال) داشته (Marvie Mohadjer, 2006)، جزو عناصر اکسین – هیرکانی محسوب می‌شود. پیشینه حضور آن‌ها در جنگل‌های خزری به دوران سوم زمین-شناسی برمی‌گردد و از این نظر به‌عنوان یکی از درختان بازمانده اقلیمی دوره پلیوسین در جنگل‌های شمال محسوب می‌شود (Akhani *et al*., 2010). این گونه انحصاری ایران بوده و از اهمیت خاصی بین ذخایر جنگلی جهان برخوردار است (Khazaeli *et al*., 2015). بهترین رویشگاه آن در شمال ایران در ارتفاع ۲۰ تا ٤۰۰ متر از سطح دریای آزاد قرار دارد، ولی تا ارتفاع ۱۲۰۰ متر نیز مشاهده می‌شود (Sabeti, 2009). شمشاد به‌علت تولید چوب با ارزش، همواره مورد بی-مهری قرار گرفته و سطوح وسیعی از جنگل‌های آن بهره‌برداری شده است. امروزه به‌دلیل کاهش چشمگیر جنگل‌های آن، در فهرست گونه‌های در معرض خطر انقراض جنگل‌های خزری قرار دارد (Asadi *et al*., 2011). گونه شمشاد در جنگل‌های جلگه‌ای شمال ایران با توجه به تخریب رویشگاه‌های آن به‌صورت لکه‌های پراکنده دیده می‌شود. حضور بیماری بلایت شمشاد (*Calonectria pseudonaviculata*) و گسترش آن در جنگل‌های شمال تهدیدات را به مقدار قابل‌توجهی افزایش داده است. در سال ۱۹۹٤ برای اولین بار علائم یک بیماری جدید روی درختان شمشاد در نهالستان واقع در Hampshire انگلستان که موجب علائم سوختگی در گونه‌های شمشاد شده بود، مشاهده شد (Henricot *et al*., 2000; Gehesquiere *et al*., 2016). بلایت شمشاد از بلژیک (Crepel and Inghelbrecht, 2003)، آلمان (Brand, 2005)، ایتالیا (Saracchi *et al*., 2008)، سوئیس (Saracchi *et al*., 2008)، هلند (Henricot *et al*., 2008)، ایرلند (Henricot *et al*., 2008)، اسپانیا (Varela *et al*., 2009)، کرواسی (Cech *et al*., 2010)، جمهوری چک (Safrankova *et al*., 2012)، فرانسه (Crepel and Inghelbrecht, 2003; Saurat *et al*., 2012)، ترکیه (Akilli *et al*., 2012)، ایالات‌متحده امریکا (Ivors *et al*., 2012)، سوئد (CABI/EPPO, 2012)، اسلوونی (CABI/EPPO, 2012)، دانمارک (CABI/EPPO, 2012)، استرالیا (CABI/EPPO, 2012)، کانادا (Elmhirst *et al*., 2013) گزارش شد. بلایت شمشاد در ایران اولین بار توسط Rezaee و همکاران (2013) از جنگل‌های لیره‌سر و جیسا متعلق به تنکابن گزارش شد. قارچ عامل بیماری بلایت شمشاد *Cylindrocladium buxicola* شناخته شد و نام علمی و مشخصات ریخت‌شناسی آنامورف (فرم غیرجنسی) بیمارگر معرفی شد (Rezaee *et al*., 2013). در پژوهشی دیگر، برای اولین بار به‌طور رسمی از ایران تلئومرف (فرم جنسی) بیمارگر بلایت شمشاد با نام *C. pseudonaviculata* معرفی شد (Mirabolfathy *et al*., 2013). مکانیزم ظهور علائم بلایت در اثر تولید فیتوتوکسین‌ها توسط پاتوژن و یا ایجاد اختلال در سیستم‌های آوندی است. روی برگ‌ها لکه‌های تیره‌رنگ و در پشت آن‌ها بار قارچی سفیدرنگ دیده می‌شود که به‌سرعت موجب خشکیدگی و ریزش شدید برگ‌ها

می‌شود. عامل بیماری دارای چرخه‌های بیماری کوتاه و سریع بوده و هر چرخه بیماری در شرایط مناسب کمتر از یک هفته تکمیل می‌شود (Henricot and Gulham, 2002). درنتیجه پیشرفت بیماری خیلی سریع بوده به‌طوری‌که در سال ۱۳۹۱ در سطح وسیع‌تری از دیگر عرصه‌های شمشاد استان گیلان و جنگل‌های شمشاد مازندران مشاهده شد و انتشار بیماری به‌سرعت از غرب به شرق هیرکانی توسعه و گسترش یافته است؛ بنابراین این گونه در حال حاضر در معرض تهدید شدید و در-حال انقراض است. برای احیای جنگل‌ها و حفظ این گونهٔ ارزشمند ضرورت دارد که نحوهٔ تکثیر، تولید و پرورش آن مورد بررسی قرار گیرد. کشت بافت به‌عنوان یک روش مناسب و سریع می‌تواند در زمینه جمع‌آوری، ذخیره‌سازی، تکثیر ژرم‌پلاسم گیاهی و تولید پایه‌های مناسب و عاری از بیماری شمشاد خزری مورد توجه قرار گیرد. کاربرد تکنیک‌های کشت بافت برای اصلاح ژنتیکی گیاهان منجر به توسعه مدل‌های سازگاری بهتر در مقابل تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شود. همچنین موجب صرفه‌جویی در زمان و مکان برای اصلاح‌گران شده و آن‌ها را قادر به انتخاب و کنترل فشارهای محیطی می‌گرداند. علاوه بر این تکنیک‌های کشت بافت با ارائه روش‌های مناسب برای غلبه بر محدودیت‌ها می‌توانند مزایای زیادی را در برنامه‌های اصلاحی داشته باشند (Pasqual *et al.*, 2014). البته تاکنون کشت بافت این گونه در داخل کشور انجام نشده است و در خارج از کشور دو پژوهش در کشور چین انجام شده است. پژوهش‌های درون شیشه‌ای گونه شمشاد مرواریدی (*Buxus sinica var. Parvifolia*) با هدف رفع خواب بذر و تکثیر غیرجنسی توسط Niu (2008) انجام شد. مناسب‌ترین روش ضدعفونی بذرها، کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۸ دقیقه و ریزنمونه‌های ساقه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ٦ دقیقه به‌دست آمد. بهترین زمان برای تهیه ریزنمونه‌ها اردیبهشت‌ماه تعیین شد. Li (2011) به‌منظور تکثیر بیشتر و کارآمد شمشاد (*B. sinica var. Parvifolia*) روش بهینه برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها را، محلول کلرید جیوه ($HgCL_2$) ۰/۱ درصد به‌مدت ۲ دقیقه و نرخ آلودگی ریزنمونه‌های ساقه ۲۳/۲٦ درصد تعیین شد. ازآنجایی‌که حفظ و تکثیر پایه‌های برتر شمشاد خزری به طریق غیرجنسی برای تولید در مقیاس انبوه برای جنگلکاری و احیای جنگل-های شمشاد خزری و همچنین پژوهش‌های بعدی مانند بررسی دلایل حساسیت بالای این گونه نسبت به عامل بیماری و یافتن پایه‌های مقاوم آن به این بیماری مهلک از اهمیت قابل‌توجهی برخوردار است؛ بنابراین آشنایی با تکثیر درون‌شیشه‌ای آن و به‌ویژه تولید کالوس در سطح انبوه می‌تواند پایه پژوهش‌های زیستی شمشاد خزری و نجات این گونه باشد. ازآنجایی‌که پژوهشی در زمینهٔ کشت بافت شمشاد خزری گزارش نشده است، این پژوهش با هدف یافتن بهترین ریزنمونه و فصل نمونه‌برداری تحت تأثیر تیمارهای مختلف ضدعفونی (سترون‌سازی) برای رسیدن به دستورالعمل مناسب و بهینه برای پژوهش‌های کشت بافت شمشاد خزری انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد پژوهش

ذخیره‌گاه جنگلی شمشاد با ٤۲۰ هکتار وسعت در ۱۵ کیلومتری جنوب غربی بندرگز و ۱۰ کیلومتری جنوب شرقی گلوگاه و در منطقه روستاهای چشمه بلبل و لیوان، طول جغرافیایی ٥۳°٥۳َ تا ٥٤°۲۰َ شرقی و عرض جغرافیایی ۳٦°٤٥َ تا ۳٦°٤۷َ شمالی واقع شده است. حداقل ارتفاع از سطح دریا ۲۰ متر و حداکثر آن ٦۰۰ متر است. میانگین بارندگی سالانه ٦۲٥/۸ میلی‌متر و دمای متوسط سالیانه ۱۳/٤۸ درجه سانتی‌گراد گزارش

شده است. آب‌وهوای منطقه بر اساس روش آمبرژه نیمه‌مرطوب معتدل گزارش شده است. گونه‌های درختی موجود در ذخیره‌گاه شامل بلوط (بلند مازو)، ممرز، افرا پلت، انجیلی، لرگ و آزاد و گونه‌های درختچه‌ای شامل ازگیل، ولیک و آلوچه است.

روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه ریزازدیادی و کشت بافت گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در فصل پاییز ۱۳۹۵ (آبان ماه) و فصل بهار ۱۳۹٦ (اردیبهشت‌ماه) انجام شد. برای ارزیابی بهترین ریزنمونه و فصل رویشی برای کشت بافت شمشاد خزری با مراجعه به ذخیره‌گاه چشمه بلبل بندرگز اقدام به برداشت شاخه‌های جوان نیمه‌خشبی شد (دو تا سه ساله)، شاخه‌ها بلافاصله در داخل کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفته و به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس ریزنمونه‌ها از بخش‌های مختلف گیاه مانند برگ‌ها و ساقه‌ها تهیه شدند. ابتدا پیش‌تیمارهای ضدعفونی شامل جدا کردن قسمت‌های پوسیده و قدیمی و شستشوی اولیه ریزنمونه‌ها با آب معمولی حاوی چند قطره مایع ظرف‌شویی به‌مدت چهار تا پنج دقیقه به‌منظور حذف آلودگی‌های سطحی انجام شد. ریزنمونه‌ها با آب مقطر پنج بار آبکش شدند. سپس در زیر هود استریل سترون-سازی با استفاده از تیمارهای مختلف (جدول ۱) ضدعفونی شده و بعد از اعمال هر تیمار، پنج بار با آب مقطر استریل‌شده آبشویی و در پایان ریزنمونه‌های مناسب (نمونه‌های برگی به‌اندازه نیم الی یک سانتی‌متر مربع و نمونه‌های ساقه به‌اندازه پنج الی ۱۰ میلی‌متر) از مواد گیاهی جدا و در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) در داخل پتری‌های استریل‌شده در کنار شعله قرار داده شدند. به‌منظور اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در اتاق رشد با دمایی معادل ۱±۲٦ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس و تاریکی (انکوباتور) به‌مدت ۲۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند. پتری‌ها هر روز بررسی شده و در صورت مشاهده آلودگی، ریزنمونه‌های سالم به پتری جدید انتقال داده شدند.

جدول ۱- تیمارهای به‌کار گرفته‌شده برای ضدعفونی ریزنمونه‌های شمشاد خزری

Table 1. Treatments used for disinfection of explants of *Buxus hyrcana*

محیط Medium		تیمار Treatment
PDA	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۲ دقیقه Mercury chloride /1% for 2 minutes	1
	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ٤ دقیقه Mercury chloride /1% for 4 minutes	2
	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ٦ دقیقه Mercury chloride /1% for 6 minutes	3
	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۸ دقیقه Mercury chloride /1% for 8 minutes	4
	هیپوکلریت سدیم ۵/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۲ دقیقه sodium hypochlorite5.5% + alcohol70% each, 2 minutes respectively	5
	هیپوکلریت سدیم ۵/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ٤ دقیقه sodium hypochlorite5.5% + alcohol70% each, 4 minutes respectively	6

ادامهٔ جدول ۱.

Continued table 1.

تیمار Treatment		محیط Medium
7	کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه mercuric chloride /1% (2 min) + sodium hypochlorite 1.5% + alcohol 70% each 1 minute	
8	قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) Fungicide Benomyl /1% (10 min) + Mercury chlor ide /1% (3 min)	
9	قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) Fungicide benomyl /5% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min)	
10	قارچ‌کش رورال تی‌اس ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) Fungicide Reveral TS /5% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min)	
11	قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)+ الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۳ دقیقه) Fungicide Benomyl /1% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min) + Alcohol70% (3 min) + Sodium hypochlorite 1/5% (3 min)	PDA
12	قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)+ الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۳ دقیقه) Fungicide Benomyl /5% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min) + Alcohol70% (3 min) + Sodium hypochlorite 1/5% (3 min)	
13	قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۳ دقیقه) Fungicide Benomyl /1% (10 minutes) + alcohol 70% (3 minutes) + sodium hypochlorite1.5% (3 min)	

تجزیه‌وتحلیل آماری

طرح آماری مورد استفاده در همهٔ آزمایش‌ها (چهار آزمایش) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۳ تیمار ضدعفونی و شش تکرار و در هر تکرار شش ریزنمونه انجام شد؛ بنابراین درمجموع ۳۱۲ تشتک پتری و ۱۸۷۲ ریزنمونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا تبعیت داده‌های اصلی و تبدیل‌شده از توزیع نرمال به‌وسیله آزمون کولموگروف اسمیرونوف و همگن بودن واریانس‌ها به‌وسیله آزمون لون بررسی شد. به‌منظور بررسی تفاوت یا عدم تفاوت تیمارهای مختلف ضدعفونی بر اساس هر یک از ریزنمونه‌ها (برگ اردیبهشت‌ماه، ساقه اردیبهشت‌ماه، برگ آبان ماه و ساقه آبان ماه) با توجه به نرمال‌بودن و همگن‌بودن داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. پس از معنی‌دار-شدن اختلاف تیمارهای ضدعفونی در ریزنمونه‌های مختلف، برای مقایسه جزئی‌تر میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج

به‌منظور کاهش آلودگی و بهینه‌سازی ریزنمونه‌های شمشاد خزری برای پژوهش‌های کشت بافت آن و همچنین برای رسیدن به بهترین ریزنمونه و فصل نمونه-گیری از تیمارهای مختلف ضدعفونی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اختلاف معنی‌داری بین

تیمارهای مورداستفاده وجود دارد (Sig ≤.05) (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس ریزنمونه‌های شمشاد خزری

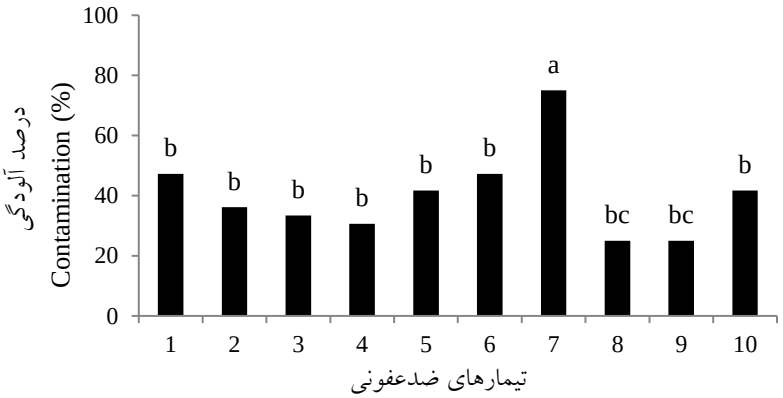
Table 2. Analysis of variance of explants of *Buxus hyrcana*

آلودگی برگ اردیبهشت‌ماه Leaf May Contamination	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	F	Sig.
بین گروهی Between Group	34059.829	12	2838.319	5.784	0.000**
درون‌گروهی Within Group	31898.148	65	490.741		
کل Total	65957.977	77			
آلودگی برگ آبان ماه Leaf November Contamination	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	F	Sig.
بین گروهی Between Group	50633.903	12	4219.492	15.631	0.000**
درون‌گروهی Within Group	17546.296	65	269.943		
کل Total	68180.199	77			
آلودگی ساقه اردیبهشت‌ماه Stem May Contamination	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	F	Sig.
بین گروهی Between Group	54351.852	12	4529.321	15.663	0.000**
درون‌گروهی Within Group	18796.296	65	289.174		
کل Total	73148.148	77			
آلودگی ساقه آبان ماه Stem November Contamination	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	F	Sig.
بین گروهی Between Group	60783.476	12	5065.290	18.142	0.000**
درون‌گروهی Within Group	18148.148	65	279.202		
کل Total	78931.624	77			

نتایج مربوط به ریزنمونه‌های برگ در اردیبهشت‌ماه

شکل ۱ نتایج مربوط به درصد آلودگی ریزنمونه‌های برگ اردیبهشت‌ماه را در تیمارهای مختلف ضدعفونی نشان می‌دهد. مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی-داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمارهای هشت (قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰

دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)) و نه (قارچ-کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) کمترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشتند (شکل ۱).



شکل ۱- مقدار آلودگی ریزنمونه‌های برگ اردیبهشت‌ماه در تیمارهای مختلف ضدعفونی، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون آماری دانکن در سطح پنج درصد است.

Figure 1. The amount of contamination of leaf samples of May in different treatments of disinfection. Different letters indicate a significant difference based on Duncan's test at the 5% level.

نتایج مربوط به ریزنمونه‌های ساقه در اردیبهشت‌ماه

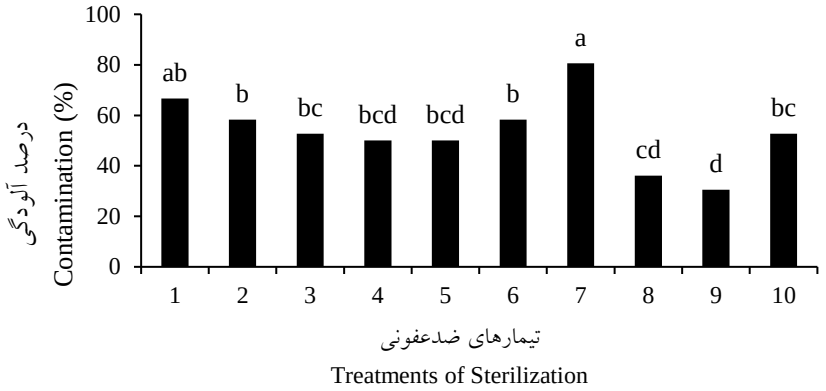
شکل ۲ نتایج مربوط به درصد آلودگی ریزنمونه‌های ساقه اردیبهشت‌ماه را در تیمارهای مختلف ضدعفونی نشان می‌دهد. مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی-داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمار نه (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) کمترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها دارد (شکل ۲).

نتایج مربوط به ریزنمونه‌های برگ در آبان ماه

شکل ۳ نتایج مربوط به درصد آلودگی ریزنمونه‌های برگ آبان ماه را در تیمارهای مختلف ضدعفونی نشان می‌دهد. مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد+ الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی-داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمار نه (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) کمترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها دارد (شکل ۳).

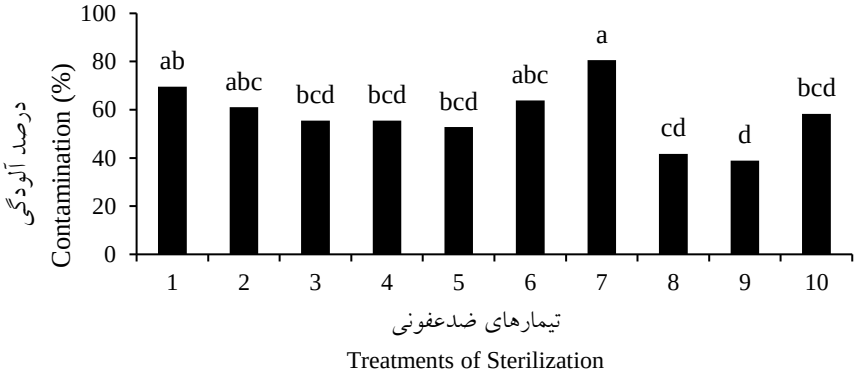
نتایج مربوط به ریزنمونه‌های ساقه در آبان ماه

شکل ٤ نتایج مربوط به درصد آلودگی ریزنمونه‌های ساقه آبان ماه را در تیمارهای مختلف ضدعفونی نشان می‌دهد. مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد+ الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی-داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمار نه (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) کمترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد (شکل ٤).



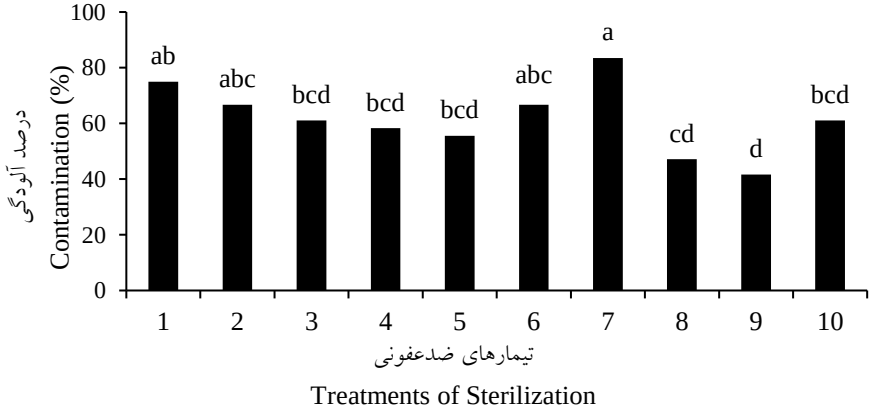
شکل ۲- مقدار آلودگی ریزنمونه‌های ساقه اردیبهشت‌ماه در تیمارهای مختلف ضدعفونی، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون آماری دانکن در سطح پنج درصد است.

Figure 2. The amount of contamination of stem samples of May in different treatments of disinfection. Different letters indicate a significant difference based on Duncan's test at the 5% level.



شکل ۳- مقدار آلودگی ریزنمونه‌های برگ آبان ماه در تیمارهای مختلف ضدعفونی، حروف متفاوت لاتین نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون آماری دانکن در سطح پنج درصد است.

Figure 3. The amount of contamination of leaf samples of November in different treatments of disinfection, Latin letters indicate a significant difference based on Duncan's test at the 5% level.



شکل ٤- مقدار آلودگی ریزنمونه‌های ساقه آبان ماه در تیمارهای مختلف ضدعفونی، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی-داری بر اساس آزمون آماری دانکن در سطح پنج درصد است.

Figure 4. The amount of contamination of stem samples of November in different treatments of disinfection. Different letters indicate a significant difference based on Duncan's test at the 5% level.

بحث

شمشاد خزری یکی از گونه‌های انحصاری و ارزشمند ایران بوده و از اهمیت خاصی در بین ذخایر جنگلی جهان و ایران برخوردار است (Khazaeli *et al*., 2015). شمشاد به‌علت تولید چوب با ارزش، همواره مورد بی-مهری قرار گرفته و سطوح وسیعی از جنگل‌های آن تخریب شده است. از طرفی علاوه بر فشارهای محیطی، حضور بیماری بلایت شمشاد (*C. pseudonaviculata*) و گسترش آن در جنگل‌های شمشاد خزری تهدیدات را به مقدار قابل‌توجهی افزایش داده است. کنترل آلودگی‌های میکروبی در ریزنمونه‌هایی که از اکوسیستم‌های طبیعی گرفته شده یک چالش بزرگ در کشت بافت گیاهی است (Daud *et al*., 2012). آلودگی‌های میکروبی در ریزنمونه‌ها به عامل‌های مختلفی مانند نوع گونه، سن، فصل نمونه‌برداری و شرایط آب و هوایی بستگی دارد (Magaña, 2012، Read and Preece, 2014)؛ بنابراین آلودگی‌های درون شیشه‌ای یکی از مشکلات کشت بافت بوده و از مهم-ترین مراحل کار در کشت بافت است و باید دقت کرد که علاوه بر از بین بردن آلودگی‌ها سبب مرگ ریزنمونه نشود. در این پژوهش برای تعیین روش مناسب ضدعفونی ریزنمونه‌ها از روش‌های متعددی (۱۳ تیمار مختلف) استفاده شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده شدت ضدعفونی در تیمارهای ۱۱ (قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)+ الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۳ دقیقه))، ۱۲ (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)+ الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۳ دقیقه)) و ۱۳ (قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۳ دقیقه)) بالا بوده که منجر به سوختن ریزنمونه‌های گیاهی شدند. نتایج تجزیه واریانس ده تیمار مختلف نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد استفاده در فصول و ریزنمونه‌های مختلف وجود دارد ($Sig \leq .05$) (جدول ۲). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های برگ در اردیبهشت-ماه (فصل بهار) تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته (۷۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمارهای هشت ((قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)) و نه (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) کمترین درصد آلودگی را داشته (۲۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشتند (شکل ۱). در بسیاری از پژوهش‌ها کلرید جیوه ($HgCl_2$)، اتانول (C_2H_6O) و هیپوکلریت سدیم (NaClO) به‌تنهایی یا استفاده به‌صورت هم‌زمان از آن‌ها به‌عنوان بهترین تیمار ضدعفونی معرفی شدند (Daud *et al*., 2012، Mihaljević *et al*., 2013، Read and Preece, 2014). این در حالی است که در ریزنمونه‌های برگ فصل بهار در این پژوهش کمترین آلودگی مربوط به تیمار هشت و نه که استفاده هم‌زمان قارچ‌کش بنومیل و کلرید جیوه بود، به‌دست آمد. با توجه به شرایط منطقه که دچار بیماری شده چنین به‌نظر می‌رسد، اسپور قارچ عامل بیماری درختان سالم را هم آلوده کرده است که می-بایستی قبل از استفاده از ریزنمونه‌ها در محیط کشت بافت برای ضدعفونی و کاهش آلودگی میکروبی از قارچ‌کش استفاده کرد. همچنین نتایج این بخش از پژوهش نشان داد استفاده از قارچ‌کش به‌همراه کلرید جیوه می‌تواند آلودگی را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (شکل ۱). Niu (2008) و Li (2011) روش بهینه برای

ضدعفونی‌کردن ریزنمونه‌ها را محلول کلرید جیوه ($HgCL_2$)، ۰/۱ درصد به‌مدت دو دقیقه و نرخ آلودگی ریزنمونه‌ها ۲۳/۲۶ درصد به‌دست آوردند که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. با توجه به نتایج تیمارهای هشت و نه کمترین درصد آلودگی را نشان دادند، ازآنجایی‌که ماهیت تیمارهای هشت و نه یکسان بوده تنها تفاوت آن‌ها در درصد قارچ‌کش به‌کار گرفته شده‌است، چنانچه در تیمار هشت به‌صورت ۱/ درصد بوده اما در تیمار نه به‌صورت ۰/۵ درصد بوده بنابراین تیمار هشت نسبت به تیمار نه ترجیح داده می‌شود. برای اولین بار در سال ۱۹٦۸ بنومیل به‌عنوان قارچ‌کش گزارش شد و در سال ۱۹۷۱ توسط شرکت آمریکایی Du Pont در بازار به فروش رسید (Dane and Dalgiç, 2005). بنومیل یک قارچ‌کش سیستمیک و از گروه قارچ‌کش‌های بنزیمیدازول است که برای طیف وسیعی از میکروارگانسیم‌ها مانند بی‌مهرگان و همچنین برای بسیاری از بیماری‌های قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dane and Dalgiç, 2005). پژوهش‌های زیادی برای کنترل بیماری‌های گیاهی با استفاده از قارچ‌کش بنومیل گزارش شده است (Dane and Dalgiç, 2005، Mamza *et al*., 2010، Daud *et al*., 2012، Sawant *et al*., 2017). با توجه به نتایج حاصل از ریزنمونه‌های ساقه در اردیبهشت‌ماه (فصل بهار) تیمار هفت (کلرید جیوه ۱/ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته (۸۵/۵۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمار نه (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)) کمترین درصد آلودگی را داشته (۳۰/۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها دارد (شکل ۲). با توجه به نتایج ریزنمونه‌های ساقه نسبت به برگ در فصل بهار آلودگی بیشتری داشته است. چنین به‌نظر می‌رسد که با گذشت زمان (از فصل بهار به فصل پاییز) ازآنجایی‌که ریزنمونه‌ها مدت‌زمان بیشتری با محیطی که اسپور قارچ‌ها و دیگر میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا پراکنده‌اند، در تماس‌اند بنابراین شدت آلودگی در آن‌ها بیشتر بوده است و برای کنترل آلودگی آن‌ها می‌بایستی از تیمارهای قوی‌تری استفاده کرد. نتایج حاصل از ریزنمونه‌های برگ در آبان ماه (فصل پاییز) تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته (۸۰/۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمار نه (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) کمترین درصد آلودگی را داشته (۳۸/۹ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها دارد (شکل ۳). با توجه به نتایج ریزنمونه‌های برگ در فصل پاییز نسبت به ریزنمونه‌های برگ و ساقه در فصل بهار دارای آلودگی بیشتر است. چراکه نسبت به ریزنمونه‌های فصل بهار مدت تماس بیشتری با محیط بوده‌اند). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های ساقه در آبان ماه (فصل پاییز) تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته (۸۳/۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمارهای هشت (قارچ‌کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)) و نه (قارچ‌کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) کمترین درصد آلودگی را داشته (٤۱/٦۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشتند (شکل ٤)؛ بنابراین مشخص می‌شود که ریزنمونه‌های ساقه در

فصل پاییز نسبت به ریزنمونه‌های برگ و ساقه در فصل بهار و ریزنمونه‌های برگ در فصل پاییز آلودگی بیشتری دارند. این موضوع می‌تواند به‌دلایل ذیل باشد: ۱- با گذشت زمان از فصل رویش جدید (از فصل بهار به فصل پاییز) مدت‌زمانی که گیاه در تماس با محیط قرار می‌گیرد افزایش یافته و همین امر موجب افزایش آلودگی می‌شود. ۲- از فصل رویش به فصل پاییز لایه مومی سطح کوتیکول و سایر موارد مانند گردوخاک و همچنین رشد خود گیاه افزایش یافته، این موجب می‌شود شدت آلودگی در ریزنمونه‌ها بالاتر رود. ۳- ریزنمونه‌های ساقه نسبت ریزنمونه‌های برگ با توجه به بافت سخت آن‌ها دارای آلودگی بیشتری‌اند. با توجه به نتایج کلی این پژوهش مشخص می‌شود ریزنمونه‌های فصل بهار نسبت به ریزنمونه‌های فصل پاییز دارای آلودگی میکروبی کمتری هستند. از طرفی ریزنمونه‌های برگی نسبت به ریزنمونه‌های ساقه درصد آلودگی کمتری از خود نشان دادند؛ بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود بهترین فصل نمونه‌گیری برای به حداقل رساندن آلودگی در محیط کشت بافت برای گونه شمشاد خزری فصل رویش (اردیبهشت‌ماه) و ریزنمونه‌های برگ است. همچنین با توجه به نتایج بهترین تیمار ضدعفونی ریزنمونه‌های برگی در فصل بهار این گونه ارزشمند جنگلی که در حال حاضر اکوسیستم‌های آن دچار بیماری بلایت شمشاد بوده، تیمار هشت یعنی ((قارچ کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)) است. بیماری بلایت شمشاد یکی از مشکلاتی است که در چند سال اخیر موجب ازبین‌رفتن سطوح زیادی از اکوسیستم‌های آن شده با توجه به اینکه این گونه اندمیک بوده و از گونه‌های ارزشمند اکوسیستم جنگلی ایران بوده بنابراین آشنایی با شیوه تولید درون شیشه‌ای آن و یافتن دستورالعمل مناسب کشت بافت آن، این پژوهش می‌تواند پایه پژوهش‌های زیستی بعدی در این زمینه باشد.

References

- Akhani, H., M. Djamali, A. Ghorbanalizadeh & E. Ramezani, 2010. Plant biodiversity of Hyrcanian relict forests, N Iran: An overview of the flora, vegetation, palaeoecology and conservation, *Pakistan Journal of Botany*, 42: 231- 258.
- Akilli, S., Y. Z. Katircioglu, K. Zor & S. Maden, 2012. First report of box blight caused *by Cylindrocladium pseudonaviculatum* in the Eastern Black Sea region of Turkey, *New Disease Reports*, 25: 23.
- Brand, T., 2005. Occurrence of *Cylindrocladium buxicola* B. Henricot on boxwood in Northwest-Germany. (Auftreten von Cylindrocladium buxicola *B. henricot* an buchsbaum in Nordwest-Deutschland.), *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 57(12): 237-240.
- CABI/EPPO., 2012. *Cylindrocladium buxicola*. [Distribution map], Distribution Maps of Plant Diseases, No.October. Wallingford, UK: CABI, Map 996 (Edition 2).
- Cech, T., D. Diminic & K. Heungens, 2010. *Cylindrocladium buxicola* causes common box blight in Croatia, *New Disease Reports*, 22.
- Crepel, C. & S. Inghelbrecht, 2003. First report of blight on *Buxus spp*. caused by *Cylindrocladium buxicola* in Belgium, *Plant Disease*, 87(12): 1539-1539.
- Dane, F. & O. Dalgiç, 2005. The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (Allium cepa L.) root apical meristem, *Acta Biologica Hungarica*, 56(1-2): 119-128.
- Daud, N. H., S. Jayaraman & R. Mohamed, 2012. Methods Paper: An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of Aquilaria malaccensis from field sources into tissue culture, *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol*, 2: 55-58.
- Elmhirst, J. F., B. E. Auxier & L. A. Wegener, 2013. First report of box blight caused by Cylindrocladium pseudonaviculatum (C.

buxicola) in British Columbia, *Canada*, *Plant Disease*, 97(4): 559-560.
- Asadi, H., S. M. Hosseini, O. Esmailzadeh & A. Ahmadi, 2011. Flora, Life form and chorological study of Box tree (*Buxus hyrcanus Pojark*.) sites in Khybus protected forest, Mazandaran, *Iranian Journal of Plant Biology*, 3(8): 27-40. (In Persian)
- Gehesquière, B., J. A. Crouch, R. E. Marra, K. Van Poucke, F. Rys, M. Maes & K. Heungens, 2016. Characterization and taxonomic reassessment of the box blight pathogen *Calonectria pseudonaviculata*, introducing Calonectria henricotiae sp. Nov, *Plant Pathology*, 65(1): 37-52.
- Henricot, B. & A. Culham, 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting Buxus spp., and its phylogenetic status, *Mycologia*, 94(6): 980-997.
- Henricot, B., A. Pérez Sierra & C. Prior, 2000. A new blight disease on Buxus in the UK caused by the fungus *Cylindrocladium*, *Plant Pathology*, 49(6): 805-805.
- Henricot, B., C. Gorton, G. Denton & J. Denton, 2008. Studies on the control of *Cylindrocladium buxicola* using fungicides and host resistance, *Plant Disease*, 92(9): 1273-1279.
- Ivors, K., W. Lacey, D. Milks, S. M. Douglas, M. K. Inman, R. E. Marra & J. A. LaMondia, 2012. First report of boxwood blight caused by *Cylindrocladium pseudonaviculatum* in the United States, *Plant Disease*, 96(7): 1070.
- Khazaeli, P., S. Rezaee, M. Mirabolfathy, H. Zamanizade & H. Kia-daliri, 2015. Report of Boxwood blight extension to Golestan province forests, *Entomology and Phytopathology*, 83(1): 85-86. (In Persian)
- Larson, P. D., 1999. Boxwood: Its History, Cultivation, Propagation and Descriptions, Foliar Press, Virginia.
- Li, H., 2011. Study on Embryogenic callus induction of *Buxus sinica* Var. *parvifolia*, Master thesis, 98 p.
- Magana, M., 2012. Developing a Standardized *in vitro* sterilization method for field-grown *moringa oleifera* explants, A Thesis Submitted to the University of Belize in Fulfillment of BIOL 4992 - Independent Research, 29P.
- Mamza, W. S., A. B. Zarafi & O. Alabi, 2010. In vitro evaluation of six fungicides on radial mycelial growth and regrowth of Fusarium pallidoroseum isolated from castor (Ricinus communis) in Samaru, Nigeria, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(2): 116-122.
- Marvie Mohadjer, M. R., 2006. Silviculture. Publications of Tehran University, Tehran, Iran
- Mihaljević, I., K. Dugalić, V. Tomaš, M. Viljevac, A. Pranjić, Z. Čmelik & Z. Jurković, 2013. In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska'sour cherry, *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 58(2): 117-126.
- Mirabolfathy, M., Y. Ahangaran, L. Lombard & P. W. Crous, 2013. Leaf blight of Buxus sempervirens in northern forests of Iran caused by Calonectria pseudonaviculata, *Plant Disease*, 97(8): 1121-1122.
- Niu, L., 2008. A Study on tissue culture and Seed dormancy releasing for *Buxus sinica* var. *parvifolia*. Master thesis, 102 p.
- Pasqual, M., J. D. Soares & F. A. Rodrigues, 2014. Tissue Culture Applications for the Genetic Improvement of Plants, *Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*, 225: 157-199.
- Read, P. E. & J. E. Preece, 2014. Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. In: Neal Van Alfen, editor-in-chief, *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*: 2(1): 317-336.
- Rezaee, S., H. Kia-daliri, K. Sharif, Y. Ahangaran & S. Hajmansoor, 2013. Boxwood blight caused by *Cylindrocladium buxicola* in Tonekabon forest, *Entomology and Phytopathology*, 80(2): 197-198. (In Persian)
- Sabeti, H. A., 2009. Trees and shrubs Iran, Yazd University, Yazd, Iran, 810p (in Persian).
- Šafránková, I., M. Kmoch & L. Holkova, 2012. First report of *Cylindrocladium buxicola* on box in the Czech Republic, *New Disease Reports*, 25.
- Saracchi, M., F. Rocchi, C. Pizzatti & P. Cortesi, 2008. Box blight, a new disease of *Buxus* in Italy caused by *Cylindrocladium buxicola*, *Journal of plant pathology*, 581-584
- Saurat C., C. Fourrier & R. Ioos, 2012. First report of blight disease on *Buxus* caused by *Cylindrocladium buxicola* in France, *Plant Disease*, 96(7): 1069.
- Sawant, I. S., P. N. Wadkar, S. B. Ghule, Y. R. Rajguru, V. P. Salunkhe & S. D. Sawant,

2017. Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of Trichoderma afroharzianum with sulphur, *Biological Control*, 114: 133-143.

- Van Laere, K., D. Hermans, L. Leus & J. Van Huylenbroeck, 2015. Interspecific hybridisation within *Buxus* spp, *Scientia Horticulturae*, 185: 139-144.

- Varela, C. P., B. G. Penalta, J. M. Vázquez & O. A. Casal, 2009. First report of *Cylindrocladium buxicola* on Buxus sempervirens in Spain, *Plant Disease*, 93(6): 670-670.

Evaluation type of explants and season of sampling under different disinfection treatments for the tissu culture of *Buxus hyrcana* Pojark

A. Mohamadzade[1] V. Payam Noor[*2] and M.R, Kavosi[3]

1- PhD. Student, Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Golestan, I. R. Iran. (ecology2020@yahoo.com)
2- Associate Professor, Deptartment of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Golestan, I. R. Iran. (mnoori56@gmail.com)
3- Associate Professor, Deptartment of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Golestan, I. R. Iran. (kavosi.reza66@gmail.com)

Received: 11.05.2018 Accepted: 02.09.2018

Abstract

The aim of this study was to find the best explants and sampling period under different sterilization treatments in order to achieve a suitable and optimal protocol for tissue culture studies in Buxus sp. Explants were prepared from different parts of the plant, including leaves and stems. At first, detergent disinfection treatments and initial washing with ordinary water containing a few drops of liquid dish for four to five minutes were performed to remove surface contamination. The Explants were flushed with distilled water five times. Then, under laminar Floe sterilization, use 13 different treatments and disinfect five times each treatment with distilled autoclaved leachate and at the end of the appropriate samples (leaf samples of 0.5 to 1 cm Squares and stem samples of 5 to 10 mm) were isolated from plant material and placed on a PDA medium inside autoclaved petri dishes alongside a flame. In order to measure the contamination, cultures in a growth room with a temperature of 26 ± 1 ° C with a light intensity of 1000 to 1500 lux and dark (incubator) were investigated. The results showed that samples of spring season have less microbial contamination than those in the autumn season. On the other hand, leaf samples showed less contamination percentage compared to stem explants.

Keywords: Boxblight, Treatments of sterilization, *Buxus hyrcana* Pojark, Tissu culture.

[*] Corresponding author Tel: +989113735812