

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

استفاده از ترکیبات مناسب
در حذف آلودگی‌های سطحی ریز نمونه‌های شمشاد جنگلی
در شرایط درون‌شیشه‌ای

نگارش:

اکرم احمدی، سپیده زوار و سعید شعبانی

ISBN : 978-964-473-599-8



۱۴۰۴

عنوان طرح منتج به نشریه فنی	شماره مصوب
کارایی پرسیدین ۱۵ درصد پرسیدین، پلاس، پرسیدین آکوا و سوپر پرسیدین در حذف آلودگی از ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی در شرایط کشت درون شیشه‌ای	۴-۵۷-۰۹-۱۲۶-۰۰۱۲۸۲



عنوان نشریه: استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی در شرایط درون شیشه‌ای
نگارش:

اکرم احمدی - استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.
سپیده زوار - محقق، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.
سعید شعبانی - استادیار پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.
مدیر داخلی: فاطمه عباسپور
ویراستار ادبی: اصغر احمدی
صفحه آرا: مریم نوبخت

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی / مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان.
نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.
سندوق پستی: ۱۱۶ - ۱۳۱۸۵ **تلفن:** ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وبسایت:** www.rifr-ac.ir
شمارگان: الکترونیکی
نوبت و سال انتشار: اول - ۱۴۰۴

این نشریه به شماره ۶۷۳۴۱ در تاریخ ۱۴۰۴/۰۲/۲۱ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

❖ مخاطبان:

- محققان و اعضای هیئت علمی، کارشناسان منابع طبیعی، جنگل کاران، سایر علاقه‌مندان

❖ شما با مطالعه این نشریه با موارد زیر آشنا می‌شوید:

- نحوه استریلیزاسیون یا ضدعفونی کردن ریزنمونه شمشاد جنگلی در شرایط درون‌شیشه‌ای
- تعیین بهترین ترکیب و غلظت مناسب برای ضدعفونی گونه شمشاد جنگلی (*Buxus hyrcana*)

فهرست

۱.....	چکیده
۱.....	مقدمه
۳.....	کشت بافت گیاهی
۴.....	ریزازدیادی و اهمیت ریزازدیادی
۴.....	استفاده از ضد عفونی کننده ها در رفع آلودگی ها
۵.....	گیاه، ریز نمونه و مواد ضد عفونی مورد استفاده
۵.....	روش کار استریلیزاسیون
۸.....	ریز نمونه و ماده ضد عفونی کننده مناسب
۱۰.....	نتیجه گیری
۱۱.....	منابع

استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی / ۱

در شرایط درون‌شیشه‌ای

چکیده

گونه شمشاد هیرکانی (*Buxus hyrcana*) از جمله گونه‌های گیاهی در خطر انقراض است که تکثیر درون‌شیشه‌ای این گونه با ارزش می‌تواند از انقراض این گونه جلوگیری کند. با توجه به اهمیت این گونه و لزوم یک روش ضدعفونی کارآمد، نیاز به ارائه یک روش مناسب برای ضدعفونی ریزنمونه‌های آن برای استفاده در ریزازدیادی و فعالیتهای اصلاحی است. با درنظر گرفتن اصل دستیابی به اهداف از پیش تعیین شده، این نشریه به محققان و اصلاح‌گران این امکان را می‌دهد که با روش مناسب حذف آلودگی سطحی از ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی آشنا شوند.

واژه‌های کلیدی: شمشاد هیرکانی، تکثیر درون‌شیشه‌ای، ریزنمونه، استریلیزاسیون

مقدمه

شمشاد خزری یا شمشاد هیرکانی (*Buxus hyrcana* Pojark) یک گونه درختچه‌ای همیشه‌سبز و پهن‌برگ است که در جنگل‌های شمال ایران رشد می‌کند (شکل ۱). این درختچه به ارتفاع ۵ تا ۶ متر و گاهی تا ۱۵ متر می‌رسد و دارای برگ‌های سبز تیره و براق است. گل‌های آن به رنگ سبز مایل به زرد و میوه‌اش پوشینه‌ای کوچک با دانه‌های سیاه رنگ است (شکل ۲). شمشاد هیرکانی به‌عنوان یک گونه بومی و اندمیک، اهمیت حفاظتی بالایی دارد و به نور مستقیم آفتاب حساس است. جنگل‌های این گونه محل زندگی انواع گیاهان و جانوران است و شمشادها به‌دلیل رشد کند و چوب سخت و گران‌قیمت خود شناخته می‌شوند. این گونه در جامعه بلوط شمشادستان (*Quercus Buxetum*) با دیگر گونه‌های درختی مانند افرا و راش همراه است و در مناطقی مانند نمک‌آبرود و گرگان ذخیره‌گاه‌هایی دارد (۱).

۲ / استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی
در شرایط درون‌شیشه‌ای

قدمت حضور درختچه‌های شمشاد در جنگل‌های خزری به دوران سوم زمین‌شناسی برمی‌گردد و از این نظر به‌عنوان یکی از درختچه‌های بازمانده اقلیمی دوره پلیوسین در جنگل‌های شمال محسوب می‌شود. با توجه به بیماری بلایت و آفت شب‌پره شمشاد که خسارت‌های بسیاری را به این گونه کمیاب و با ارزش وارد نموده‌اند، حفظ و تکثیر این گونه اهمیت بسیاری در حفظ تنوع زیستی گونه‌ها به‌ویژه این گونه که به‌عنوان شاخص تنوع زیستی در جنگل‌های شمال مطرح است، دارد. به‌طورکلی، در کشور ما مطالعات چندانی بر روی این گونه با ارزش انجام نشده است. در این نشریه، ماده ضدعفونی‌کننده مناسب برای حذف آلودگی از ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی با غلظت بهینه ارائه خواهد شد.



شکل ۱- درختان شمشاد در رویشگاه اصلی

استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی / ۳
در شرایط درون‌شیشه‌ای



شکل ۲- بذر، کپسول حاوی بذر و برگ شمشاد جنگلی

کشت بافت گیاهی

کشت بافت گیاهی یک ابزار کلیدی در زیست‌فناوری است که به دلیل ویژگی‌هایی مانند توتی‌پوتنسی (توانایی باززایی یک موجود کامل از یک سلول) و قابلیت سنتز متابولیت‌های ثانویه با ارزش، کاربردهای گسترده‌ای دارد. این روش به تولید و اصلاح گیاهان مقاوم به تنش‌های مختلف، افزایش کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی و عاری‌سازی گیاهان از ویروس‌ها کمک می‌کند. در هشتاد سال گذشته، پیشرفت‌های علمی در این حوزه امکان دستیابی به منافع اقتصادی قابل توجهی را فراهم کرده است (۲). کشت بافت همچنین به نجات و تکثیر گونه‌های گیاهی کمیاب و در حال انقراض کمک می‌کند و می‌تواند در شرایط عاری از بیماری، متابولیت‌ها و محصولات ثانویه گیاهی را در تمام طول سال تولید کند. پیش‌بینی می‌شود که در دهه‌های آینده، تولیدات حاصل از بیوتکنولوژی به‌طور قابل توجهی در بازارهای جهانی افزایش یابد (۳).

ریزازدیادی و اهمیت ریزازدیادی

ریزازدیادی یکی از جنبه‌های تجاری کشت درون‌شیشه‌ای است که مزایای زیادی نسبت به روش‌های متداول ازدیاد رویشی دارد. هدف آن تولید انبوه گیاهچه‌های همسان از نظر ژنتیکی با رشد طبیعی، در کمترین زمان و هزینه ممکن است. انتخاب منبع ریزنمونه مناسب و عاری از آلودگی، اولین گام در برنامه‌های کشت بافت موفق است. استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده مناسب می‌تواند به کاهش آلودگی و هزینه‌ها کمک کند، به‌ویژه در مورد ریزنمونه‌های جنگلی که مستعد آلودگی بیشتری هستند. تولید گیاهان از طریق ریزازدیادی در آزمایشگاه‌ها و نهالستان‌ها، روشی کلیدی برای تکثیر اقتصادی گیاهان است. این فناوری امکان تکثیر حجم زیادی از گیاهان را در زمان کوتاه و در فضای محدود، در تمامی فصول سال و بدون توجه به شرایط آب و هوایی فراهم می‌کند (۴).

استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها در رفع آلودگی‌ها

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 (۵). استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها در ضدعفونی کردن سطح مهمترین مرحله در آماده‌سازی ریزنمونه در کشت درون‌شیشه‌ای است که در کنترل باکتری‌ها و قارچ‌ها مؤثر هستند (۶). از این‌رو، برای ریزازدیادی موفق باید شرایط استریل برای کشت فراهم گردد. همچنین، در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، کلیه مواد مورد استفاده، دستگاه‌ها و هر چیزی که در هنگام عمل کشت بافت، کاربر با آن سروکار دارد، باید استریل گردد. از این‌رو، استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده که بتواند آلودگی را به حداقل برساند در کاهش هزینه مالی و زمانی می‌تواند مؤثر باشد (۲).

استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی / ۵
در شرایط درون‌شیشه‌ای

گیاه، ریزنمونه و مواد ضدعفونی مورد استفاده

ریزنمونه مناسب برای ریزازدیادی گونه شمشاد جنگلی، سرشاخه و بذر است. ترکیبات مورد استفاده در این تحقیق شامل پرسیدین (Percidine)، پرسیدین پلاس (Percidine Plus)، سوپرپرسیدین (Super Percidine) و پرسیدین آکوا (Aqua Percidine) می‌باشد. این ترکیبات به صورت ضدعفونی سطحی از ریزنمونه و در ترکیب با محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند. یادآوری می‌شود که روش معمول (استفاده از هیپوکلریت سدیم) که در کشت بافت، به طور عمده استفاده می‌شود به عنوان شاهد استفاده شد. محصول سوپر پرسیدین حاوی ۲۲ درصد پراستیک اسید و پرسیدین آکوا نیز حاوی ۴۶ درصد آب اکسیژنه (H_2O_2) و ۰/۰۷ درصد نیترات نقره (Silver Nitrate) است.

روش کار استریلیزاسیون

ابتدا در آزمایشگاه به منظور پیش سترون سازی، ریزنمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب با چند قطره مایع ظرفشویی مورد شستشو قرار گرفته و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در قارچ کش بنومیل (۱ درصد) قرار داده شود. بعد از آبشویی، در زیر هود استریل، ضدعفونی ریزنمونه‌ها با محصولات ضدعفونی کننده برای کاهش آلودگی سطحی از ریزنمونه‌ها اعمال گردد (جدول ۱). سپس، ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت قرار داده شوند (شکل ۳). در روش استفاده از ترکیبات ضدعفونی کننده قبل از کشت، بعد از ضدعفونی ریزنمونه‌ها، مواد گیاهی بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ قرار گیرند. در روش دوم، ترکیبات ضدعفونی کننده در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر در ترکیب با محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). سپس، ظروف حاوی ریزنمونه‌ها را در شرایط رشدی با دمای 1 ± 25 درجه سانتی گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شوند (شکل ۴).

۶ / استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی
در شرایط درون‌شیشه‌ای

بررسی آلودگی (آماربرداری) به صورت هفتگی انجام شده و تا یک ماه ادامه یابد (شکل ۵) و نتایج ثبت شود.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده در ضدعفونی سطحی از بذر
و سرشاخه گونه شمشاد جنگلی در ترکیب با محیط کشت

ردیف	تیمارهای ضدعفونی
۱	استفاده از اتانول ۹۶ درصد و هیپوکلریت سدیم (۳:۱ مخلوط با آب) و شستشو با آب مقطر سه بار به مدت ۱۰ دقیقه (روش معمول)
۲	استفاده از پرسیدین ۱۵ درصد (غلظت ۲،۱ و ۴ درصد) به مدت ۵ دقیقه و بعد سه بار شستشو با آب مقطر (۱۰ دقیقه)
۳	استفاده از پرسیدین ۱۵ درصد (غلظت ۲،۱ و ۴ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه و بعد سه بار شستشو با آب مقطر (۱۰ دقیقه)
۴	استفاده از پرسیدین آکوا (غلظت ۲،۱ و ۴ درصد) به مدت ۵ دقیقه و بعد سه بار شستشو با آب مقطر (۱۰ دقیقه)
۵	استفاده از پرسیدین آکوا (غلظت ۲،۱ و ۴ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه و بعد سه بار شستشو با آب مقطر (۱۰ دقیقه)
۶	استفاده از سوپر پرسیدین (غلظت ۲،۱ و ۴ درصد) به مدت ۵ دقیقه و بعد سه بار شستشو با آب مقطر (۱۰ دقیقه)
۷	استفاده از سوپر پرسیدین (غلظت ۲،۱ و ۴ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه و بعد سه بار شستشو با آب مقطر (۱۰ دقیقه)
۱	محیط کشت MS+ پرسیدین ۱۵ درصد (غلظت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)
۲	محیط کشت MS+ پرسیدین آکوا (غلظت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)
۳	محیط کشت MS+ سوپر پرسیدین (غلظت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)
۴	محیط کشت MS+ پرسیدین پلاس (غلظت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر)

استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی / ۷
در شرایط درون‌شیشه‌ای



شکل ۳- کشت ریزنمونه سرشاخه بر روی محیط کشت



شکل ۴- نگهداری محیط‌های کشت در اتاق کشت در شرایط کنترل شده

۸ / استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی
در شرایط درون‌شیشه‌ای



شکل ۵- مشاهده آلودگی‌ها در محیط کشت

ریزنمونه و ماده ضدعفونی کننده مناسب

طبق نتایج این پژوهش، به‌طور کلی، میزان آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذر است. آلودگی در نمونه‌های شاهد به میزان بالا (۹۰-۱۰۰ درصد) بود و از بین مواد مورد استفاده، سوپر پرسیدین نسبت به بقیه ضدعفونی‌کننده‌ها توانست آلودگی‌های سطحی از سطح ریزنمونه‌ها را به نحو مؤثری کاهش دهد. غلظت‌های مورد استفاده بر روی کاهش آلودگی تأثیر دارد، به‌طوری‌که کمترین آلودگی در سطح ۴ درصد حجمی-حجمی و بیشترین آلودگی در سطح صفر درصد مشاهده شد که با افزایش غلظت، میزان آلودگی کاهش می‌یابد. مؤثرترین مواد در کاهش آلودگی سطحی از سطح ریزنمونه سرشاخه، سوپرپرسیدین و در ریزنمونه بذر، آکواپرسیدین و سوپرپرسیدین است. سوپرپرسیدین ۲ و ۴ درصد در کاهش

استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی / ۹

در شرایط درون‌شیشه‌ای

آلودگی سطحی قارچی و باکتریایی از ریزنمونه سرشاخه مؤثر هستند اما یادآوری می‌گردد که غلظت ۴ درصد سبب سوختگی و خشکیدگی کامل ریزنمونه‌ها می‌شود (شکل ۶).



شکل ۶- سوختگی ریزنمونه سرشاخه در سوپرپرسیدین ۴ درصد

بنابراین، غلظت مناسب برای ریزنمونه سرشاخه شمشاد جنگلی، سوپر پرسیدین ۲ درصد است. در استفاده از ترکیبات ضدعفونی‌کننده در ترکیب با محیط کشت، سوپرپرسیدین با غلظت ۴۰۰ میکرولیتر بهترین کارایی را در مهار آلودگی در کشت بافت شمشاد جنگلی نشان داد. در این تحقیق، ریزنمونه بذری در غلظت‌های صفر یا شاهد بیشترین میزان آلودگی را داشت و کمترین آلودگی در غلظت‌های مختلف سوپر پرسیدین (۲ و ۴ درصد) (به ترتیب ۸۶/۷ و ۸۱/۲ درصد کاهش آلودگی سطحی) اتفاق افتاد که هر دو برای ریزنمونه بذر قابل استفاده است.

نتیجه‌گیری

نوع ریزنمونه، نوع ماده و غلظت ضدعفونی‌کننده در میزان بروز آلودگی در محیط کشت تأثیر دارد، به‌طوری‌که آلودگی در ریزنمونه سرشاخه بیشتر از ریزنمونه بذری بود. با توجه به میزان آلودگی بیشتر در ریزنمونه‌های سرشاخه در مقایسه با بذر، می‌توان بیان کرد که به‌دلیل مدت تماس بیشتر ریزنمونه‌ها با محیط آلوده و از سویی نوع بافت ریزنمونه است.

بذرهای جمع‌آوری شده از رویشگاه طبیعی نیز آلوده هستند و قادر به جوانه‌زنی در شرایط درون‌شیشه‌ای نیستند.

در گونه جنگلی شمشاد به‌دلیل آلودگی بسیار در اکوسیستم جنگلی، سوپرپرسیدین با داشتن مواد مؤثره‌ای مانند پراکسی استیک اسید، حاوی هیدروژن پراکساید و اسید استیک گلاسیال کارایی بالایی در ضدعفونی ریزنمونه سرشاخه دارد.

در ریزنمونه سرشاخه، سوپرپرسیدین ۲ درصد کارایی خوب و مناسبی را در کاهش آلودگی دارد، در صورتی‌که سوپر پرسیدین ۴ درصد با وجود کاهش بیشتر آلودگی به‌دلیل ایجاد سوختگی و اثر بر روی زنده‌مانی ریزنمونه، گزینه مناسبی نیست.

دو ماده ضدعفونی‌کننده سوپرپرسیدین (۲ و ۴ درصد) و آکواپرسیدین (۴ درصد) می‌توانند در رفع آلودگی‌های سطحی از بذرهای شمشاد جنگلی مفید واقع شوند.

ماده ضدعفونی‌کننده سوپرپرسیدین با غلظت ۴۰۰ میکرولیتر در لیتر در ترکیب با محیط کشت گزینه مناسبی در حذف آلودگی‌ها است.

استفاده از ترکیبات مناسب در حذف آلودگی‌های سطحی ریزنمونه‌های شمشاد جنگلی / ۱۱

در شرایط درون‌شیشه‌ای

منابع

۱. رجایی، الف.، گرایلی، ش.، حسینی‌نصر، س. م. ۱۳۹۲. بررسی وضعیت اکولوژیکی، حفاظتی و اقتصادی گونه جنگلی شمشاد. سومین کنفرانس بین‌المللی برنامه‌ریزی و مدیریت محیط زیست.
۲. قاسمی بزدی، ک. و احمدی، الف. ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی سلول و بافت، انتشارات مخدومقلی فراغی. ۲۵۴ صفحه.
3. El-Sherif, N.A. (2018). Impact of Plant Tissue Culture on Agricultural Sustainability. Part of the Handbook of Environmental Chemistry book series (HEC, volume 77).
4. Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M.K., El-Mahrouk, M.E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T.A. and Judit, D. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae*. 8(677): 1-28.
5. Ray, S.S., Ali, N. 2017. Biotic Contamination and Possible Ways of Sterilization: A Review with Reference to Bamboo Micropropagation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 59: e160485.
6. Mihaljevic, I., Dugalic, K., Tomas, V., Viljevac, M., Pranjic, A. and et al. (2013). In vitro sterilization procedures for micropropagation of oblacinska sour cherry. *The Journal of Agricultural Science*. 58: 117-126.