

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

الله‌وردی محمدزاده<sup>۱</sup>، وحیده پیام نور\*<sup>۲</sup> و محمدرضا کاوسی<sup>۳</sup>

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 پذیرش: ۹۷/۰۶/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۱

### 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 به مدت چهار تا پنج دقیقه به منظور 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  $26 \pm 1$  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 برگ نسبت به ریزنمونه‌های ساقه درصد آلودگی کمتری از خود نشان دادند.

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

## مقدمه

قابل توجهی افزایش داده است. در سال ۱۹۹۴ 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 Ingelbrecht, 2003)، آلمان (Brand, 2005)، ایتالیا (Sarachchi et al., 2008)، سوئیس (Sarachchi 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 Ingelbrecht, 2003; Saurat et al., 2012)، ترکیه (Akilli et al., 2012)، ایالات متحده امریکا (Ivors et al., 2012)، سوئد (CABI/EPPO, 2012)، اسلونی (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

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 ۴۰۰ 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

برای تهیه ریزنمونه‌ها اردیبهشت‌ماه تعیین شد. Li (2011) به منظور تکثیر بیشتر و کارآمد شمشاد (*B. sinica var. Parvifolia*) روش بهینه برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها را، محلول کلرید جیوه ( $HgCl_2$ ) ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه و نرخ آلودگی ریزنمونه‌های ساقه ۲۳/۲۶ درصد تعیین شد. از آنجایی که حفظ و تکثیر پایه‌های برتر شمشاد خزری به طریق غیرجنسی برای تولید در مقیاس انبوه برای جنگلکاری و احیای جنگل‌های 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 مهملک از اهمیت قابل توجهی 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. از آنجایی که پژوهشی در زمینه 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 ۴۲۰ هکتار وسعت در ۱۵ کیلومتری جنوب غربی بندرگز و ۱۰ کیلومتری جنوب شرقی گلوگاه و در منطقه روستاهای چشمه بلبل و لیوان، طول جغرافیایی  $53^{\circ}53'$  تا  $54^{\circ}20'$  شرقی و عرض جغرافیایی  $36^{\circ}45'$  تا  $36^{\circ}47'$  شمالی واقع شده است. حداقل ارتفاع از سطح دریا ۲۰ متر و حداکثر آن ۶۰۰ متر است. میانگین بارندگی سالانه ۶۲۵/۸ میلی‌متر و دمای متوسط سالیانه ۱۳/۴۸ درجه سانتی‌گراد گزارش

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). در نتیجه پیشرفت بیماری خیلی سریع بوده به طوری که در سال ۱۳۹۱ در سطح وسیع‌تری از دیگر عرصه‌های شمشاد استان گیلان و جنگل‌های شمشاد مازندران مشاهده شد و انتشار بیماری به سرعت 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 گونه ارزشمند ضرورت دارد که نحوه 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 به مدت ۸ دقیقه و ریزنمونه‌های ساقه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۶ دقیقه به دست آمد. بهترین زمان

اولیه ریزنمونه‌ها با آب معمولی حاوی چند قطره مایع ظرف‌شویی به مدت چهار تا پنج دقیقه به منظور حذف آلودگی‌های سطحی انجام شد. ریزنمونه‌ها با آب مقطر پنج بار آبکشی 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 استریل شده آبشویی و در پایان ریزنمونه‌های مناسب (نمونه‌های برگ‌ها به اندازه نیم الی یک سانتی‌متر مربع و نمونه‌های ساقه به اندازه پنج الی ۱۰ میلی‌متر) از مواد گیاهی جدا و در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) در داخل پتری‌های استریل شده در کنار شعله قرار داده شدند. به منظور اندازه‌گیری آلودگی، کشت‌ها در اتاق رشد با دمایی معادل  $26 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ لوکس و تاریکی (انکوباتور) به مدت ۲۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند. پتری‌ها هر روز بررسی شده و در صورت مشاهده آلودگی، ریزنمونه‌های سالم به پتری جدید انتقال داده شدند.

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 ۱۳۹۶ (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 به سرعت 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

جدول ۱- تیمارهای به‌کار گرفته‌شده برای ضدعفونی ریزنمونه‌های شمشاد خزری

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

تیمار	محیط
Treatment	Medium
1	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه Mercury chloride /1% for 2 minutes
2	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۴ دقیقه Mercury chloride /1% for 4 minutes
3	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۶ دقیقه Mercury chloride /1% for 6 minutes
4	کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۸ دقیقه Mercury chloride /1% for 8 minutes
5	هیپوکلریت سدیم ۵/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به ترتیب ۲ دقیقه sodium hypochlorite 5.5% + alcohol 70% each, 2 minutes respectively
6	هیپوکلریت سدیم ۵/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به ترتیب ۴ دقیقه sodium hypochlorite 5.5% + alcohol 70% each, 4 minutes respectively

ادامه جدول ۱.

Continued table 1.

محیط Medium	تیمار Treatment
	کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هر کدام به ترتیب ۱ دقیقه
	7
	mercuric chloride /1% (2 min) + sodium hypochlorite 1.5% + alcohol 70% each 1 minute
	قارچ کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)
	8
	Fungicide Benomyl /1% (10 min) + Mercury chlor ide /1% (3 min)
	قارچ کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)
	9
	Fungicide benomyl /5% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min)
	قارچ کش رورال تی اس ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)
	10
	Fungicide Reveral TS /5% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min)
PDA	قارچ کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)
	11
	Fungicide Benomyl /1% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min) + Alcohol 70% (3 min) + Sodium hypochlorite 1/5% (3 min)
	قارچ کش بنومیل ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)
	12
	Fungicide Benomyl /5% (10 min) + Mercury chloride /1% (3 min) + Alcohol 70% (3 min) + Sodium hypochlorite 1/5% (3 min)
	قارچ کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (۳ دقیقه)
	13
	Fungicide Benomyl /1% (10 minutes) + alcohol 70% (3 minutes) + sodium hypochlorite 1.5% (3 min)

### تجزیه و تحلیل آماری

آبان ماه) با توجه به نرمال بودن و همگن بودن داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. پس از معنی دار شدن اختلاف تیمارهای ضدعفونی در ریزنمونه‌های مختلف، برای مقایسه جزئی تر میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

### نتایج

به منظور 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 معنی داری بین

طرح آماری مورد استفاده در همه آزمایش‌ها (چهار آزمایش) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۳ تیمار ضدعفونی و شش تکرار و در هر تکرار شش ریزنمونه انجام شد؛ بنابراین در مجموع ۳۱۲ تشتک پتری و ۱۸۷۲ ریزنمونه گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا تبعیت داده‌های اصلی و تبدیل شده از توزیع نرمال به وسیله آزمون کولموگروف اسمیرونوف و همگن بودن واریانس‌ها به وسیله آزمون لون بررسی شد. به منظور بررسی تفاوت یا عدم تفاوت تیمارهای مختلف ضدعفونی بر اساس هر یک از ریزنمونه‌ها (برگ اردیبهشت ماه، ساقه اردیبهشت ماه، برگ آبان ماه و ساقه

تیمارهای مورد استفاده وجود دارد (Sig ≤ 0.05) (جدول

۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس ریزنمونه‌های شمشاد خزری

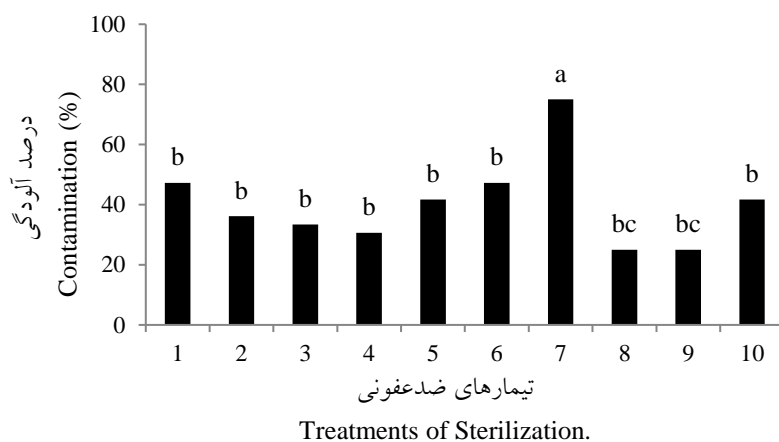
Table 2. Analysis of variance of explants of *Buxus hyrcana*

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

سدیم ۱/۵ درصد + الکلی ۷۰ درصد هر کدام به ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت معنی-داری با بقیه تیمارها دارد، این در حالی است که تیمارهای هشت (فارچ کش بنومیل ۰/۱ درصد (۱۰

نتایج مربوط به ریزنمونه‌های برگ در اردیبهشت‌ماه شکل ۱ نتایج مربوط به درصد آلودگی ریزنمونه‌های برگ اردیبهشت‌ماه را در تیمارهای مختلف ضد عفونی نشان می‌دهد. مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت

دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)) و نه (قارچ- کسش 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.

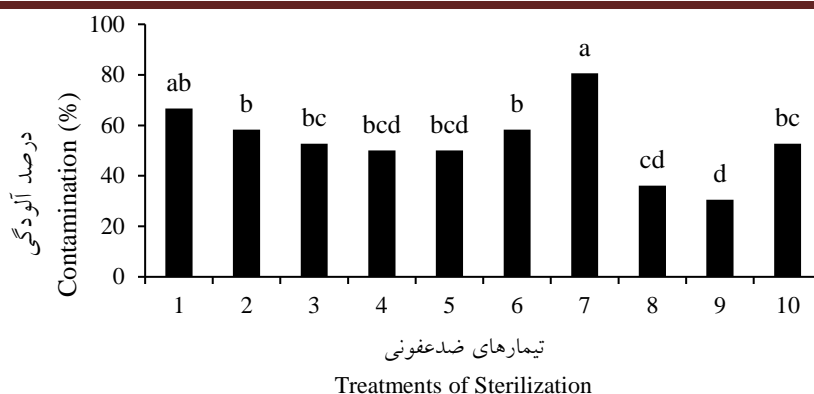
Figure 1. The amount of contamination of leaf samples of May in different treatments of disinfection. Different letters indicate a significant difference based on Duncan's test at the 5% level.

دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته 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 و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها دارد (شکل ۳).

**نتایج مربوط به ریزنمونه‌های ساقه در آبان ماه**  
 شکل ۴ 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 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 و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد (شکل ۴).

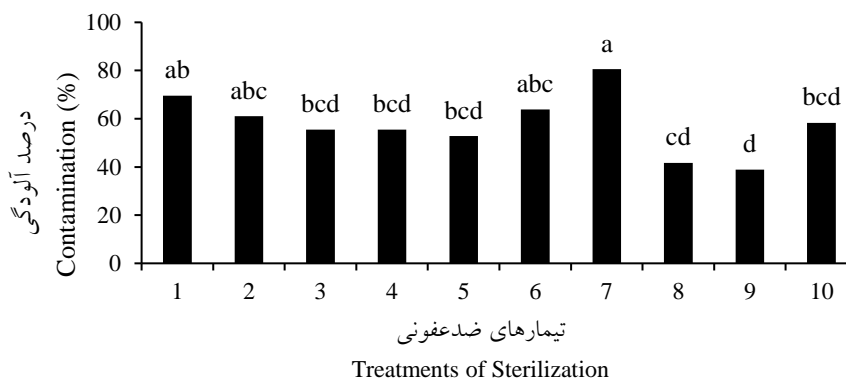
**نتایج مربوط به ریزنمونه‌های ساقه در اردیبهشت‌ماه**  
 شکل ۲ نتایج مربوط به درصد آلودگی ریزنمونه‌های ساقه اردیبهشت‌ماه را در تیمارهای مختلف ضدعفونی نشان می‌دهد. مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که تیمار هفت (کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۲ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به‌ترتیب ۱ دقیقه) بالاترین درصد آلودگی را داشته و تفاوت 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 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



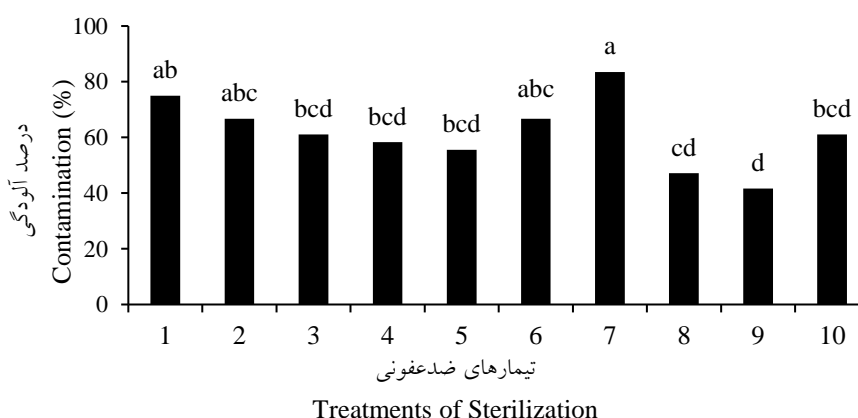
شکل ۲- مقدار آلودگی ریزنمونه‌های ساقه اردیبهشت‌ماه در تیمارهای مختلف ضدعفونی، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون آماری دانکن در سطح پنج درصد است.

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 آبان‌ماه 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 ۴- مقدار آلودگی ریزنمونه‌های ساقه آبان‌ماه در تیمارهای مختلف ضدعفونی، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری 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

ریزنمونه‌های گیاهی شدند. نتایج تجزیه واریانس ده تیمار مختلف نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد استفاده در فصول و ریزنمونه‌های مختلف وجود دارد ( $\text{Sig} \leq 0.05$ ) (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 به ترتیب 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 ( $\text{HgCl}_2$ )، اتانول ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) و هیپوکلریت سدیم ( $\text{NaClO}$ ) به‌تنهایی یا استفاده به‌صورت هم‌زمان از آن‌ها به‌عنوان بهترین تیمار ضدعفونی معرفی شدند (Daud et al., 2012; Read and Preece, 2014; Mihaljević et al., 2013). 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 می‌بایستی 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

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 بی‌مهری 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 مهم‌ترین 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

فصل بهار آلودگی بیشتری داشته است. چنین به نظر می-رسد که با گذشت زمان (از فصل بهار به فصل پاییز) از آنجایی که ریزنمونه‌ها مدت زمان بیشتری با محیطی که اسپور قارچ‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌های 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 به ترتیب 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 به ترتیب 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 (۴۱/۶۵ درصد ریزنمونه‌ها) و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشتند (شکل ۴)؛ بنابراین مشخص می‌شود که ریزنمونه‌های ساقه در

ضد عفونی کردن ریزنمونه‌ها را محلول کلرید جیوه (HgCl<sub>2</sub>)، ۰/۱ درصد به مدت دو دقیقه و نرخ آلودگی ریزنمونه‌ها ۲۳/۲۶ درصد به دست آوردند که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. با توجه به نتایج تیمارهای هشت و نه کمترین درصد آلودگی را نشان دادند، از آنجایی که ماهیت تیمارهای هشت و نه یکسان بوده تنها تفاوت آن‌ها در درصد قارچ‌کش به کار گرفته شده است، چنانچه در تیمار هشت به صورت ۱/۱ درصد بوده اما در تیمار نه به صورت ۰/۵ درصد بوده بنابراین تیمار هشت نسبت به تیمار نه ترجیح داده می‌شود. برای اولین بار در سال ۱۹۶۸ بنومیل به عنوان 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 میکروارگانیسم‌ها 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 ۰/۱ درصد + ۲ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد + الکل ۷۰ درصد هرکدام به ترتیب 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

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 برگ در فصل بهار این گونه ارزشمند جنگلی که در حال حاضر اکوسیستم‌های آن دچار بیماری بلایت شمشاد بوده، تیمار هشت یعنی ((فارچ 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 از بین رفتن 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.

فصل پاییز نسبت به ریزنمونه‌های برگ و ساقه در فصل بهار و ریزنمونه‌های برگ در فصل پاییز آلودگی بیشتری دارند. این موضوع می‌تواند به دلایل ذیل باشد: ۱- با گذشت زمان از فصل رویش جدید (از فصل بهار به فصل پاییز) مدت زمانی 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 به 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 برگ نسبت به ریزنمونه‌های ساقه درصد آلودگی کمتری از خود نشان دادند؛ بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود

## 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. (Aufreten 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. Dalgıç, 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. Kmoč & L. Holková, 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. Fourier & 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 tissue culture of *Buxus hyrcana* Pojark

A. Mohamadzade<sup>1</sup> V. Payam Noor<sup>\*2</sup> and M.R, Kavosi<sup>3</sup>

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, Department of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Golestan, I. R. Iran. (mnoori56@gmail.com)

3- Associate Professor, Department 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  $26 \pm 1$  ° 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, Tissue culture.

---

\* Corresponding author

Tel: +989113735812