



مقایسه استفاده از ترکیبات شیمیایی و آلی جهت گندزدایی ارقام سینگونیوم در شرایط درون شیشه‌ای

Comparison of the use of chemical and organic disinfectants for disinfection of *Syngonium podophyllum* L. varieties under *in vitro* conditions

مینا تقی‌زاده^{۱*}، مهسا عقیلی گواری^۲

Mina Taghizadeh^{*1}, Mahsa Aghili Gavari²

۱-دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲-کارشناس ارشد گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران

1-Associate Professor, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture
and environmental science, Arak University, Arak, Iran

2-Master of Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and
environmental science, Arak University, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email:

m-taghizadeh@araku.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۲/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۴/۱ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۴/۱)

Received: 2026/04/22 | Accepted: 2026/06/22 | Published: 2026/06/22

Abstract

Syngonium podophyllum L. ornamental plant is widely grown as a houseplant due to its diversity and tolerance to low light conditions. In addition to being unsuccessful, the use of conventional disinfectants may cause toxicity to the explants and in most cases cannot control all microorganisms. Attention has been paid to new alternative disinfectants. This study investigated disinfection with ethanol and household bleach, tobacco extract, cumin essential oils (20, 100 and 200 mg L⁻¹), antibiotics (cefazolin, chloramphenicol, streptomycin and penicillin) and different application methods (in culture medium or immersion) for *Syngonium podophyllum* varieties in several experiments. The results showed that the *in vitro* contamination depends on the varieties, method and type of disinfectant. Conventional disinfection methods were not effective in eliminating bacteria. Supplementing the culture medium with 20 mg L⁻¹ of cumin essential oil effectively inhibited bacterial growth in the Emerald Green variety. Meanwhile, cefazolin at 100 mg L⁻¹ in the medium successfully eradicated both bacterial contamination in Emerald Green and fungal contamination in the Christmas variety. Furthermore, disinfecting explants with tobacco extract for 30 minutes completely eliminated bacterial and fungal contamination across the Christmas and Emerald Green varieties. These findings suggest the potential use of compounds such as cumin and tobacco as cost-effective and sustainable disinfection alternatives, provided that the type of endogenous contamination is accurately predicted.

Keywords: antibiotic, bacteria, micropropagation, Fungal, disinfection

چکیده

رفرنس دهی این مقاله Citation

Taghizadeh M, Aghili Gavari M. (2026). Comparison of the use of chemical and organic disinfectants for disinfection of *Syngonium podophyllum* L. varieties under *in vitro* conditions. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (2): 282-297. Doi: [10.61882/gebsj.14.2.8](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.2.8)

URL: <https://gebsj.ir/article-1-543-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 14, Number 2, 2026

خلاصه

گیاه زینتی سینگونیم (*Syngonium podophyllum* L.) به دلیل تنوع و تحمل به شرایط نوری کم، به عنوان گیاه آپارتمانی تولید می شود. در روش کشت درون شیشه ای در مدت زمانی کوتاه، تعداد گیاه بیشتری تولید شده و امکان تولید ارقام جدید وجود دارد. پاتوژن ها از مهمترین عوامل محدود کننده ریزازدیادی گیاهان محسوب می شوند. استفاده از مواد متداول گندزدا ممکن است سبب ایجاد سمیت ریزنمونه شود و در بیشتر موارد نمی توانند تمامی میکروارگانیسم ها را کنترل کنند. در سال های اخیر توجه به جایگزین های جدید مواد گندزدا شده است. این پژوهش در قالب چند آزمایش به بررسی گندزدایی با اتانول و سفید کننده خانگی، عصاره توتون، اسانس زیره (۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر)، آنتی بیوتیک ها (کلرامفنیکل، سفازولین، استرپتومايسين و پنی سیلین) و روش های کاربرد (در محیط کشت یا غوطه وری) ارقام سینگونیم پرداخت. نتایج نشان داد میزان آلودگی های درون شیشه ای بستگی به رقم، روش و نوع ماده گندزدا دارد. روش های متداول گندزدایی برای حذف پاتوژن های باکتریایی کارایی لازم را نداشت. کاربرد ۲۰ میلی گرم در لیتر اسانس زیره در محیط کشت توانست از رشد باکتری در رقم Emerald Green جلوگیری کند. سفازولین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در محیط کشت قادر به کنترل آلودگی های باکتریایی (رقم Emerald Green) و قارچی (رقم Christmas) بود. گندزدایی ریزنمونه با عصاره توتون به مدت ۳۰ دقیقه آلودگی های باکتریایی و قارچی را در ارقام Christmas و Pink Allusio کنترل نمود. این یافته ها نشان دهنده استفاده بالقوه از ترکیباتی مانند زیره و تنباکو به عنوان جایگزین های مواد گندزداي مقرون به صرفه و پایدار است، مشروط بر اینکه نوع آلودگی درونزا به طور دقیق پیش بینی شود.

کلمات کلیدی: آنتی بیوتیک، باکتری، ریزازدیادی، قارچ، ضد عفونی

مقدمه

Introduction

سینگونیم با نام علمی *Syngonium podophyllum* L. که به نام های انگلیسی *Arrow Head Plant* و *Goose foot plant* شناخته می شود، یکی از معروف ترین گیاهان زینتی است که به طور وحشی در جنگل های همیشه سبز آمریکای جنوبی و آفریقا رشد می کند. رقم تجاری از سینگونیم در صنعت تولید گیاهان برگساره ای وجود دارد (Henny and Chen, 2008). سینگونیم گیاهی بالارونده با رشد سریع می باشد (Bown, 2000). سینگونیم به طور گسترده در صنعت گیاهان برگدار و به عنوان گیاهان گلدانی، سبدهای آویزان یا گیاه بالارونده تولید می شود و در درجه اول برای دکوراسیون داخلی یا فضای داخلی استفاده می گردد (Chen et al., 2006). گیاه زینتی سینگونیم به دلیل تنوع برگی رنگی و تحمل به شرایط کم نوری، از سال ۱۸۷۰ به عنوان گیاه زینتی مورد توجه قرار گرفت (Bown, 2000). ازدیاد سینگونیم از طریق قلمه های گره ای انجام می شود اما ازدیاد به روش رویشی در مقیاس وسیع نسبتاً زمان بر است (Henny, 1998). از آنجایی که قلمه ها ناقل بیماری هایی مانند لکه برگی و دمبرگ و همچنین بیماری *Rhizoctonia aerial blight* و *Xanthomonas blight* هستند، روش ازدیاد رویشی چندان مطلوب نمی باشد. از اواخر دهه ۱۹۸۰، ازدیاد سینگونیم عمدتاً از طریق کشت درون شیشه ای توسط اندامزایی انجام شد (Chen et al., 2003). ناپایداری ژنتیکی سینگونیم در شرایط ازدیاد درون شیشه ای منجر به انتخاب بسیاری از ارقام جدید با ارزش تجاری شده است (Chen et al., 2006). در نتیجه، ازدیاد این گیاه به وسیله کشت درون شیشه ای بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این روش در مدت زمان کوتاه تعداد گیاه بیشتری تولید شده و علاوه بر آن امکان تولید ارقام جدید نیز وجود دارد که می تواند سودآوری اقتصادی زیادی داشته باشند (Sosa et al., 2002).

در حال حاضر کشت درون شیشه‌ای و به‌ویژه ریزازدیادی گیاهان یکی از گسترده‌ترین کاربردهای بیوتکنولوژی است. ریزازدیادی نسبت به سایر روش‌ها مهم‌ترین روش برای ازدیاد سریع غیرجنسی گیاهان است و از نظر زمان و فضای مورد نیاز برتری اقتصادی دارد و گیاهان عاری از بیماری فراهم می‌کند. زمانی که روش‌های سنتی قادر به تأمین تقاضا برای تکثیر مواد گیاهی نباشند، این روش می‌تواند در مدت کوتاه میلیون‌ها گیاه را به صورت یکنواخت تولید کند (Cardoso et al., 2018). پاتوژن‌های درون شیشه‌ای از مشکلات بسیار جدی در ریزازدیادی هستند (Hakim and Dalimunthe, 2022). زمانی که از ریزنمونه‌های رشد یافته در شرایط طبیعی برای کشت درون شیشه‌ای استفاده شود، کنترل آلودگی به‌ویژه آلودگی‌های میکروبی داخلی اهمیت بسیاری دارد؛ در غیر این صورت آلودگی‌های قارچی و باکتریایی بروز کرده و کل ریزنمونه‌ها را از بین می‌برد (Taghizadeh, et al., 2025). مواد گندزدای مختلفی مانند هیپوکلریت سدیم، اتانول ۷۰ درصد و کلرید جیوه در غلظت‌های مختلف برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها استفاده می‌شوند (Rout, et al., 2006). استفاده از این مواد علاوه بر عدم افزایش درصد موفقیت کشت‌ها می‌تواند باعث سمیت گیاه شود، یا به دلیل قیمت بالا مقرون‌به‌صرفه نباشد و حتی نتواند تمام میکروارگانیسم‌ها را کنترل کند (Taghizadeh et al., 2025). یکی از مهم‌ترین مشکلات کشت بافت، آلودگی‌های باکتریایی درون‌زاد هستند که اغلب علائم ظاهری مشخصی ندارند (Kneifel and Leonhardt, 1992). برای رفع آلودگی‌های باکتریایی می‌توان از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد، چه به صورت افزودن مستقیم به محیط کشت و چه قبل از کشت نمونه (Al-Mayahi et al., 2010). روش‌های مختلف ضدعفونی و آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل آلودگی توصیه شده‌اند، اما برخی از آنها بهره‌وری پایینی داشته یا بر ریزنمونه‌ها اثرات سمی دارند. از طرف دیگر مقاومت روزافزون آلودگی‌ها و سمیت مواد شیمیایی پژوهشگران را به سمت استفاده از مواد ایمن‌تر سوق داده است (Taghizadeh et al., 2025). همچنین طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها در کشت درون شیشه‌ای برای محدودسازی آلودگی‌ها استفاده می‌شود و باید توجه داشت که این مواد بسته به نوع و غلظت می‌توانند عوارض نامطلوبی داشته باشند (Leifert et al., 1991). بنابراین در سال‌های اخیر توجه به جایگزین‌های جدید برای مواد گندزدای ایمن و مقرون‌به‌صرفه افزایش یافته است (Sondi and Salopek-Sondi, 2004). برای سهولت کار کشت درون شیشه‌ای و کاهش مشکلات می‌توان از مواد طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی استفاده کرد (Navarro et al., 2008).

امروزه اسانس‌ها و عصاره‌های برخی گیاهان به عنوان ترکیبات ضد باکتریایی (Taghizadeh et al., 2025)، ضد میکروبی (Henny and Chen, 2008)، ضد قارچی (Srichana et al., 2009)، ضد ویروسی و ضد انگلی مورد استفاده قرار گرفته است (Hoque et al., 2011). یکی از ویژگی‌های مهم این مواد و ترکیب‌های آن خاصیت آبگریزی است که سبب می‌شود در بخش‌های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندری باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آنها گردد (Devi et al., 2010).

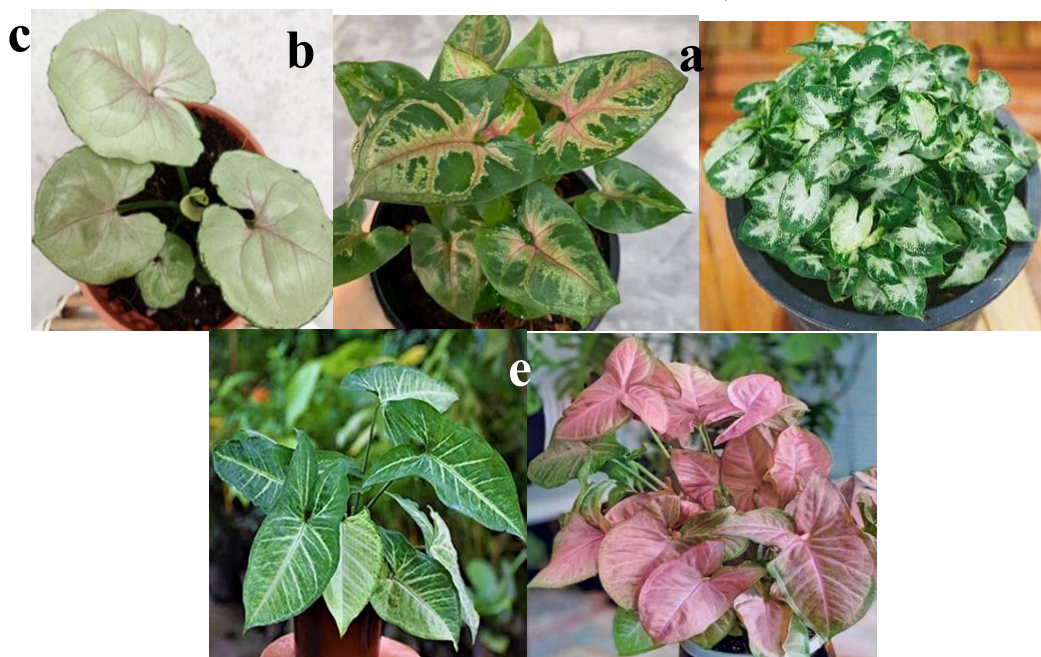
یکی از موانع مهم در مسیر ریزازدیادی گیاهان وجود آلودگی پاتوژنی فراوان در طی کشت درون شیشه‌ای می‌باشد که روش‌های گندزدایی پیچیده و هزینه‌برداری را می‌طلبد. در روش‌های متداول گندزدایی محیط کشت و مواد گیاهی از تجهیزاتی مانند اتوکلاو و مواد شیمیایی استفاده می‌شود که سبب طولانی شدن زمان این عملیات و افزایش هزینه‌ها می‌شود. آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده کشت درون شیشه گیاهان زینتی محسوب می‌شود. در کنار سایر ترکیبات، اسانس‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند خاصیت ضدعفونی‌کنندگی داشته باشند. بنابراین هدف از اجرای این پژوهش، علاوه بر معرفی آنتی‌بیوتیک‌های موثر برای استریل مواد گیاهی، کاربرد عصاره‌های گیاهی به عنوان ترکیبات سازگار با محیط زیست و نسبتاً ارزان قیمت برای کنترل و حذف آلودگی‌های درون شیشه‌ای ارقام سینگونیم به روش‌های مختلف (ترکیب ماده گندزدا با محیط کشت و غوطه‌وری ریزنمونه در ماده گندزدا) بود.

مواد و روش‌ها

Materials and Methods

در این پژوهش از ارقام جدید سینگونیم *Syngonium podophyllum* شامل؛ Berry Allusionmm, Emerald Green, Mini Pixie, Christmas و Pink Allusio استفاده شد (شکل ۱). گیاهان مادری از یک گلخانه واقع در شهر اراک تهیه شد. گیاهان مادری در معرض نور

غیر مستقیم در گلخانه دانشگاه اراک در شرایط رطوبتی ۴۰ تا ۵۰ درصد و دمای روزانه ۳۰ تا ۳۲ سلیوس و دمای شب ۲۴ تا ۲۶ درجه سلسیوس قرار گرفتند و آبیاری هفته‌ای دو بار انجام شد.



شکل ۱- رقم‌های تحت کشت درون شیشه‌ای سینگونیم در این پژوهش: (a) Christmas (b) Mini Pixie (c) Emerald (d) Berry Allusion (e) Pink Allusion

Figure 1. Syngonium variety cultured *in vitro* in this study: Christmas (a), Mini Pixie (b), Emerald (c), Berry Allusion (d), and Pink Allusion (e)

در این پژوهش از محیط کشت MS نصف غلظت دارای ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین لیتر، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم آگار استفاده شد. قبل از اتوکلاو محیط کشت با استفاده از محلول NaOH ۰/۱ نرمال pH محیط کشت در بازه ۵/۷۵ الی ۵/۸۵ تنظیم شد. پس از پوشاندن درب ظرف، در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه و فشار ۱/۲ اتمسفر استریل شد. پس از استریل محیط کشت زمانی که دمای آن حدوداً به ۴۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس رسید به طور کامل هم زده شد و به میزان ۲۰ میلی لیتر در هر پتری دیش به قطر ۹ سانتی متر توزیع شد و اجازه داده شد تا محیط کشت کامل منعقد شود. در تیمارهای دارای آنتی بیوتیک به محیط کشت، قبل از توزیع و در دمای تقریبی ۴۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس آنتی بیوتیک با غلظت مشخص به محیط کشت اضافه شد. بخش های ساقه به طول ۳-۴ سانتی متر از گیاهان مادری جدا شد و سپس ۳۰ دقیقه زیر آب جاری به همراه یک قطره توین ۲۰ شست و شوی اولیه داده شدند. سپس قطعات ساقه‌ای طی آزمایشهای زیر گندزدایی شده و ریزنمونه‌ها در ابعاد حدود ۰/۵ سانتی متر برش زده و به محیط کشت منتقل شدند. در هر تکرار که معادل یک پتری دیش بود، ۵ ریزنمونه قرار گرفت. پس از انتقال ریزنمونه‌ها، کشتها در اتاقک رشد دارای دمای بین ۲۴ الی ۲۵ درجه سلسیوس با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی دارای شدت نور نگهداری شدند.

آزمایش اول- اثر مدت زمان اتانول و سفید کننده تجاری بر گندزدایی ریزنمونه های سینگونیم

به منظور ارزیابی روش های گندزدایی متداول بخش های ساقه سینگونیم این آزمایش طراحی شد. ریزنمونه‌ها از ارقام Berry Allusionmm, Green Christmas, Mini Pixie, Emerald و Pink Allusion تهیه شد. در این آزمایش دو زمان غوطه‌وری در اتانول ۷۰ درصد (۳۰ و ۶۰ ثانیه) و ماده سفید کننده خانگی (دارای ۵ درصد کلر فعال) ۵ درصد (۱، ۲ و ۲/۵ دقیقه) اجرا شد. پس از اعمال تیمار گندزدایی ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر شست شو داده و سپس به محیط کشت منتقل شدند. این آزمایش به صورت طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد.

آزمایش دوم- اثر آنتی بیوتیک‌ها و اسانس زیره در محیط کشت بر کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای سینگونیوم

ابتدا ریزنمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سفیدکننده خانگی ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. سه نوع آنتی بیوتیک، سفازولین، پنی سیلین، کلرآمفنیکل و اسانس زیره (*Cuminum cyminum*) هرکدام در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به محیط کشت استریل اضافه شد. برای این منظور، ابتدا محلول مادر (Stock solution) از آنتی بیوتیک مذکور در آب مقطر تهیه گردید. جهت استریل سازی محیط کشت، از روش فیلتراسیون با استفاده از غشای سلولز استری با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر استفاده شد. محلول استریل شده پس از اتوکلاو کردن محیط کشت و خنک شدن آن تا دمای تقریبی ۴۵ درجه سانتی گراد، به صورت آسپتیک به محیط کشت افزوده و به دقت مخلوط گردید. جهت اعمال اثر ضد میکروبی اسانس زیره، یک امولسیون پایدار از اسانس تهیه گردید. اسانس زیره با استفاده از عامل امولسیون کننده Tween 20 با نسبت وزنی ۱:۵ مخلوط شد تا یک امولسیون یکدست تشکیل گردد. سپس، این امولسیون به عنوان محلول مادر تهیه و از طریق فیلتر استریل ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید. در نهایت، حجم مشخصی از این امولسیون استریل به محیط کشت (که پس از اتوکلاو تا دمای ۴۵ درجه سانتی گراد خنک شده بود) افزوده شد تا غلظت نهایی حاصل گردد. تمامی مراحل در شرایط کاملاً آسپتیک انجام پذیرفت. در این آزمایش از بخشهای ساقه‌ای سینگونیوم رقم Berry Allusionmm استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

آزمایش سوم- اثر سفازولین، اسانس زیره در محیط کشت و رقم بر کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای سینگونیوم

به دلیل مشاهده نکروز نسبتاً زیاد در آزمایش دوم (کاربرد آنتی بیوتیک‌ها و اسانس زیره در محیط کشت)، در این آزمایش از غلظت‌های کمتر زیره (۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) و سفازولین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در محیط کشت جهت کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای استفاده شد. از ریزنمونه‌های ساقه‌ای سینگونیوم رقم‌های Christmas, Berry Allusionmm, Mini Pixie, Emerald Green و Pink Allusio استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

آزمایش چهارم- اثر گندزدایی ریز نمونه‌ها با استرپتومایسین، عصاره توتون و رقم بر پاتوژن‌های درون شیشه‌ای سینگونیوم

در این آزمایش از محلول آنتی بیوتیک استرپتومایسین با غلظت ۳ درصد و عصاره توتون برای گندزدایی ریزنمونه‌های سینگونیوم استفاده شد. جهت تهیه محلول گندزدای توتون (*Nicotiana tabacum* L.)، ۱۰ گرم از قطعات ساقه گیاه توتون در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل قرار داده شد (غلظت ۱۰ درصد وزنی حجمی). پس از ۲۴ ساعت خیساندن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، محلول حاصل از فیلتر استریل ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد تا عصاره‌ای فاقد ذرات و آلودگی‌های میکروبی اولیه به دست آید و سپس به عنوان عامل گندزدا به کار رفت. گندزدایی به روش غوطه‌وری برای ریزنمونه‌های ساقه‌ای سینگونیوم ارقام Christmas, Emerald Green و Pink Allusio انجام شد. ریزنمونه‌ها پس از گندزدایی اولیه با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه، سفید کننده خانگی ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه، در محلول استرپتومایسین به مدت زمان‌های ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه و عصاره توتون به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌ها پس از سه بار شست و شو با آب مقطر استریل در محیط کشت قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

اندازه گیری صفات و آنالیز آماری

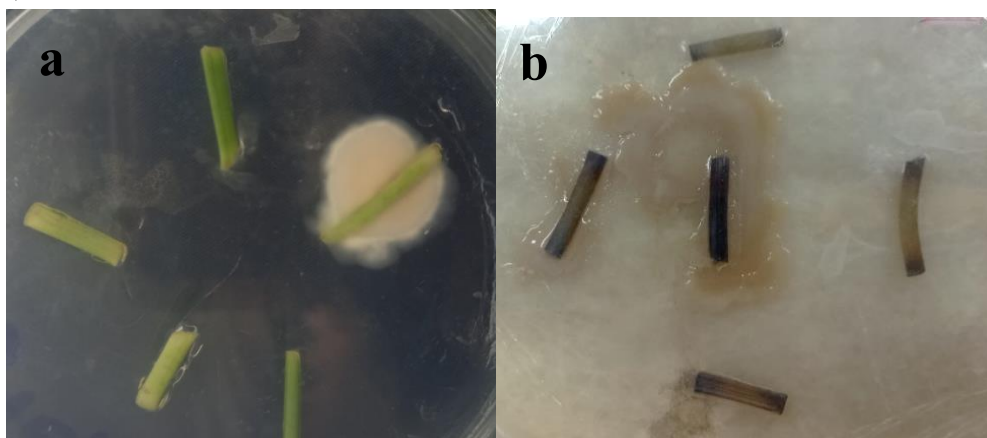
ارزیابی صفات پس از ده روز از کشت صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی در این آزمایش میزان آلودگی قارچی، باکتریایی و نکروز شدن ریزنمونه‌ها بود. نتایج این آزمایش براساس میزان نکروز شدن ریزنمونه‌های کشت شده (بر اساس علائم پدیده قهوه‌ای و سیاه شدن بافت)، میزان آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌ها (بر اساس وجود لکه‌های ژلاتینی به رنگ‌های زرد، سفید و شیری)، میزان آلودگی قارچی (بر اساس کلونی‌های میسیلیوم سفید، سیاه، سبز، زرد و صورتی) و میزان سالم بودن ریزنمونه‌های کشت شده در تیمارهای مختلف از روز اول پس از

کشت مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفت (شکل ۲). انواع آلودگی‌های باکتریایی، قارچی و ترشح فنل ریزنمونه‌های به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز پس از کشت قابل مشاهده بود. آلودگی‌های درون شیشه‌ای به صورت درصد و با اسفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$100 \times Cl = \frac{n}{N}$$

در این فرمول Cl بیان‌گر درصد آلودگی نمونه‌های کشت شده، N تعداد کل ریز نمونه‌های کشت شده و n تعداد ریزنمونه‌ای که دارای آلودگی می‌باشد.

پس از تبدیل داده‌ها به درصد و نرمال کردن داده‌های غیرنرمال با استفاده از روش لگاریتم با ANOVA، با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹) تجزیه شدند. آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری بین میانگین تیمارها انجام شد.



شکل ۲- علائم آلودگی‌های قارچی (a)، باکتریایی و نکروز شدن (b) ریزنمونه‌های ساقه‌ای سینگونیم

Figure 2. Symptoms of fungal (a), bacterial and necrosis (b) infections of *Syngonium* sp. stem explants

Results and Discussion

نتایج و بحث

آزمایش اول- اثر مدت زمان اتانول و سفید کننده تجاری بر گندزدایی ریزنمونه‌های سینگونیم

در این آزمایش ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها به دلیل آلودگی شدید باکتریایی و نکروز شدن ریزنمونه‌ها از بین رفتند. بنابراین روش‌های متداول گندزدایی دو مرحله‌ای با اتانول و سفید کننده تجاری از این تیمارها تاثیری در کنترل آلودگی‌های درون شیشه‌ای نداشت.

آزمایش دوم- اثر آنتی بیوتیک‌ها و اسانس زیره در محیط کشت بر کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای سینگونیم

باتوجه به نتایج جدول تجزیه واریانس تیمارهای گندزدایی برای کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌های سینگونیم در سطح یک درصد معنی‌دار شد ولی بر آلودگی قارچی معنی‌دار نبود (جدول ۱). با توجه به شکل ۳ با افزایش غلظت زیره در محیط کشت آلودگی باکتریایی کاملاً مهار شد و به صفر رسید. در بین آنتی‌بیوتیک‌ها فقط پنی‌سیلین با افزایش غلظت در کنترل آلودگی باکتریایی موثر بود. اسانس-ها دارای ترکیب‌های فنولی مانند تیمول، کارواکرول، گاماترپین و پاراسیمین هستند که ویژگی ضد باکتریایی قوی آنها گزارش شده است (Taghizadeh and Solgi, 2014). Burt (2004) گزارش کردند تیمول بیشتر بر آلودگی‌های باکتریایی و کارواکرول بر آلودگی‌های قارچی موثر هستند (Taghizadeh and Solgi, 2014). احتمالاً به همین دلیل است که با افزایش غلظت اسانس زیره میزان تیمول موجود در محلول بیشتر شده و خاصیت ضد باکتریایی آن افزایش می‌یابد (Taghizadeh and Solgi, 2014). در پژوهشی دیگر اثر عصاره روغنی زیره سبز روی چهار نوع باکتری بررسی شد و حداقل غلظت مهاری آن ۰/۳۷ تا ۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر برآورده شد (Oroojalian et al., 2010). در پژوهشی دیگر تمامی غلظت‌های مورد آزمایش اسانس زیره (۱۲/۵ درصد، ۲۵ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد) دارای فعالیت ضدباکتریایی در برابر

باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بودند، علاوه بر این غلظت ۱۰۰ درصد بیشترین فعالیت آنتی‌باکتریال را ایجاد کرد (Belal et al., 2017). اثر ضد میکروبی اسانس زیره سبز بر علیه باکتری‌های اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم نیز بررسی و اثبات شده است (Mekawey et al., 2009). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس‌ها اثر ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشا سلولی اعمال می‌کنند. بررسی‌های صورت گرفته در مورد سازوکار عمل اسانس‌ها اثبات نموده که این ترکیب‌ها نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهند. ترکیبات اسانس با نفوذ در غشا منجر به متورم شدن غشا گردیده و فعالیت آن را کاهش می‌دهد و در این نهایت منجر به مرگ سلول خواهد شد (Richard and Patel, 2005). یکی از ویژگی‌های مهم این مواد و ترکیب‌های آن خاصیت آبگریزی است که سبب می‌شود در بخش‌های لیپیدی دیواره سلولی و میتوکندری باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آنها گردد (Devi et al., 2010). ساز و کار اثرات بازدارنده اسانس زیره می‌تواند به حضور ترکیبات فنولی و آلدئیدی، به‌ویژه کومین آلدئید (Cuminaldehyde) نسبت داده شود. این ترکیبات با نفوذ به لایه لیپیدی غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها، باعث اختلال در نفوذپذیری انتخابی غشا و در نتیجه نشت اجزای حیاتی سلولی (مانند یون‌ها و پروتئین‌ها) می‌گردند (Singh et al., 2021).

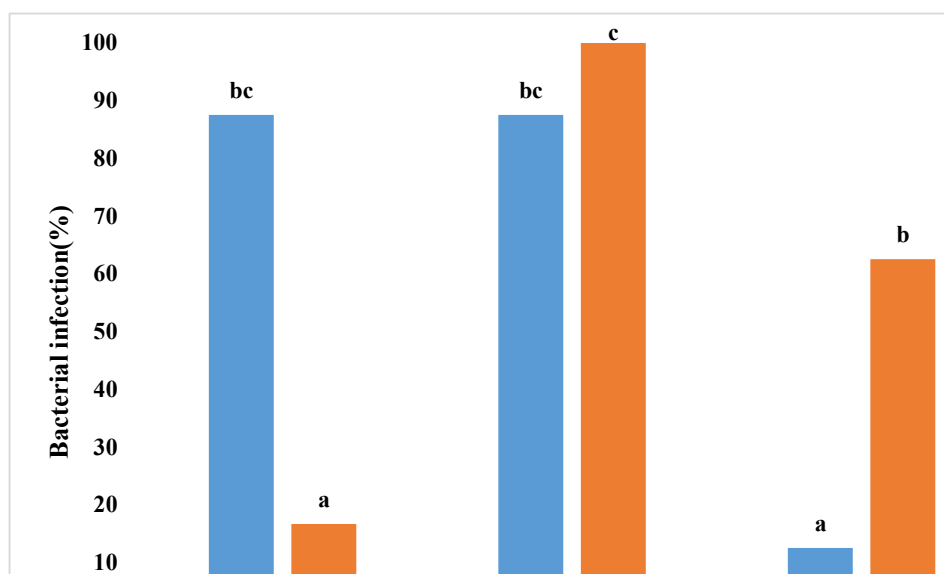
آلودگی‌های باکتریایی که منشأ داخلی دارند و در درون بافت‌های ریزنمونه هستند معمولاً با استفاده از ضد عفونی کننده‌های سطحی از بین نمی‌روند. آنتی‌بیوتیک‌ها در مواردی می‌توانند در کنترل آلودگی ریزنمونه‌ها مفید باشند و درصد آلودگی ریزنمونه‌ها را کاهش دهند (Shahryari et al., 2011). از آنتی‌بیوتیک‌های متعددی جهت کنترل آلودگی‌ها با منشأ داخلی، به صورت تنها یا ترکیبی استفاده شده است (Reed et al., 1995). بر اساس شکل ۳ در بین آنتی‌بیوتیک‌ها فقط پنی‌سیلین با افزایش غلظت (۲۰۰ میلی گرم در لیتر) در کنترل آلودگی باکتریایی موثر بود اما صد درصد نتوانست آن را کنترل کند. آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل در هر دو غلظت تاثیر بسزایی در کنترل آلودگی باکتریایی نداشت. در مطالعه‌ای روی لیلیوم، پس از ضد عفونی کردن قطعات پیاز با الکل و هیپوکلریت سدیم، آن‌ها را در محیط کشت دارای آنتی بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سیلین هر کدام با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر کشت نمودند و نتیجه مطلوبی در کنترل آلودگی به دست آوردند (Altan and Bűrün, 2010). Shirvany و همکاران (2011) گزارش کردند استفاده از ترکیب آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین (هر کدام ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) در کنترل آلودگی ریزوم‌های آلسترومیا موثر بود، همچنین نتایج این بررسی‌ها نشان داد که غلظت‌های کم هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل آلودگی موثر نمی‌باشد (Shahryari et al., 2011). همچنین در این آزمایش آنتی‌بیوتیک سفازولین در غلظت کمتر (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) اثر مهارکنندگی بهتری داشت. آنتی‌بیوتیک سفازولین از گروه سفالوسپورین‌ها علیه طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و برخی باکتری‌های گرم منفی فعال است (Shirvany et al., 2021) و تاثیر آن در این آزمایش نیز احتمالاً به همین دلیل بوده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس غلظت آنتی بیوتیک‌های مختلف و اسانس زیره بر کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های سنگونوم

Table 1- Analysis of variance of concentrations of different antibiotics and cumin essential oil on the control of *in vitro* pathogens of *Syngonium* sp. explants

SOV	df	MS	
		Bacterial infection	Fungal infection
Disinfection treatment	7	53**	71 ^{ns}
Error	24	4.3	6.4
CV(%)		29	30

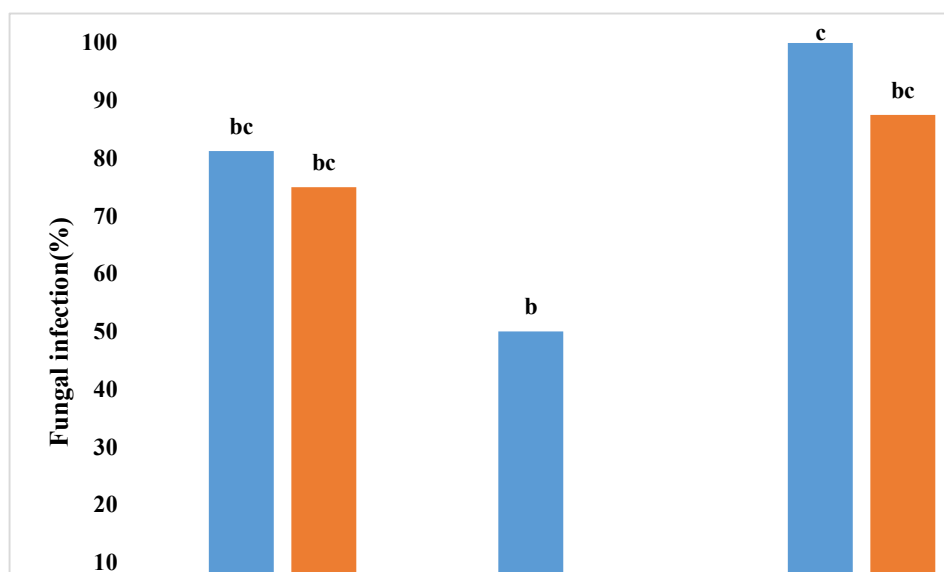
ns: No significant, **: significant at $p < 0.01$



شکل ۳- اثر غلظت آنتی بیوتیک‌های مختلف و اسانس زیره بر میزان آلودگی باکتریایی ریزنمونه‌های سینگونیم

Figure 3. Effect of different antibiotic concentrations and cumin essential oil on the bacterial contamination of *Syngonium* sp. Explants

با توجه به شکل ۴ اسانس زیره در هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم توانست آلودگی قارچی را کاملاً مهار کند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از اسانس زیره در غلظت‌های مورد استفاده، پتانسیل بسیار بالایی در کاهش آلودگی‌های میکروبی (قارچی و باکتریایی) در ریزنمونه‌های سینگونیم رقم *Berry Allusionmm* از خود نشان می‌دهد. برخلاف بسیاری از روش‌های سنتی که بر پایه استفاده از مواد شیمیایی سنتزی و آنتی‌بیوتیک‌های با طیف اثر محدود هستند، اسانس زیره توانست با حفظ نرخ بقای بافت، میزان آلودگی را به طور معنی داری کاهش دهد. این یافته با نتایج مطالعات اخیر که استفاده از ترکیبات گیاهی را به عنوان یک عامل ضدعفونی‌کننده سبز و ایمن در پروتکل‌های کشت بافت پیشنهاد می‌کنند، همسو است (Taghizadeh and Solgi, 2014; Herath et al., 2025). همچنین با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل آلودگی قارچی از ۵۰ درصد به صفر کاهش پیدا کرد. دو آنتی‌بیوتیک سفازولین و پنی‌سیلین توانستند آلودگی قارچی را مهار کنند. در اسانس زیره ترکیب کومین آلدئید دارای پتانسیل ضدقارچی است (Askari et al., 2023). اصلی ترین ترکیب ماده موثره زیره سبز آلدئید کومینیک می‌باشد که نوعی ماده محلول در آب می‌باشد و گزارش شده که اسانس زیره سبز اثر مهار کنندگی بر رشد قارچ فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس می‌باشد (Mokhtari et al., 2012). همچنین، ماهیت آبگریز اجزای اسانس‌ها این ترکیبات را قادر می‌سازد تا به ساختارهای آبگریز (لیپیدها) غشای سلولی قارچ و میتوکندری نفوذ کنند که منجر به اختلال در ساختار آنها می‌شود (Hassan et al., 2020). در نتیجه تجمع این ترکیبات در غشای سلولی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نیز می‌تواند منجر به از دست دادن انرژی و در نهایت مرگ آنها می‌شود (Cox et al., 2001). جهت کنترل قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی ناشی از *Phytophthora parasitica* با استفاده از اسانس‌های گیاهی مشخص گردید زیره در غلظت ۱۸۰ پی‌پی‌ام از رشد ۵۰ درصدی قارچ نسبت به شاهد جلوگیری نمود (Ardestani et al., 2017). با توجه به شواهد موجود اسانس زیره در غلظت کم هم (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) خاصیت ضدقارچی قابل توجه و زیادی دارد. در مطالعه‌ای از کلرامفنیکل ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در میلی‌لیتر استفاده شد که به ترتیب ۳۶/۷ و ۷۳/۳ درصد بر بسیاری از سویه‌های مخمری اثر بازدارندگی نشان داد (Jamil et al., 2014). در این آزمایش کلرامفنیکل با افزایش غلظت توانست آلودگی قارچی را کنترل کند. تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده از کلرامفنیکل در کشت بافت گیاهی ارائه نشده ولی با توجه به نتایج حاصل استفاده از کلرامفنیکل در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در کنترل آلودگی قارچی موثر می‌باشد.



شکل ۴- اثر غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها و اسانس زیره بر میزان آلودگی قارچی ریزنمونه های سینگونیم

Figure 4. Effect of antibiotic concentration and cumin essential oil on fungal contamination of *Syngonium* sp. explants

آزمایش سوم- اثر سفازولین، اسانس زیره در محیط کشت و رقم بر کنترل پاتوژن‌های درون شیشه‌ای سینگونیم
باتوجه به نتایج جدول تجزیه واریانس اثر ماده گندزدا بر آلودگی باکتریایی در سطح ۵ درصد و بر آلودگی قارچی در سطح یک درصد معنی دار شد و اثر رقم بر کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی هر دو در سطح یک درصد معنی دار شد. همچنین اثر متقابل ماده گندزدا و رقم برای آلودگی باکتریایی و قارچی در سطح یک درصد معنی دار شد. اثر ماده گندزدا و رقم و اثر متقابل آنها بر نکروز ریزنمونه ها معنی دار نشد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع ماده گندزدا و رقم بر آلودگی قارچی و باکتریایی

Table 2. Analysis of variance of the effect of disinfectant agent and variety on fungal and bacterial contamination

MS				
SOV	df	Bacterial infection	Fungal infection	Necrosis
Disinfectant agent	2	15*	7680**	0.9 ns
Variety	4	48**	916**	15 ns
Disinfectant agent× Variety	8	20**	1916**	0.2 ns
Error	30	3	361	6
CV(%)		25	23	13

ns: No significant, *: significant at $p < 0.05$, **: significant at $p < 0.01$

مقایسه میانگین اثر متقابل ماده گندزدا و رقم نشان داد با افزایش غلظت زیره میزان آلودگی باکتریایی در رقم Emerald Green کاملاً کنترل شد (صفر درصد). در تیمار سفازولین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کمترین میزان آلودگی باکتریایی در رقم‌های Emerald Green و Pink Allusio بود. تیمار زیره تنها در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر در رقم Emerald Green تا حد کمی برای کنترل آلودگی قارچی موثر بود. همچنین سفازولین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین کنترل آلودگی قارچی را به ترتیب در رقم Christmas داشت (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر نوع ماده گندزدا و رقم بر پاتوژن‌های درون شیشه‌ای ریزنمونه سیگونوم

Table 3. Comparison of the average effect of disinfectant type and variety on <i>in vitro</i> pathogens of <i>Syngonium</i> sp. explants			
Disinfectant agent (mg L ⁻¹)	Variety	Bacterial infection (%)	Fungal infection (%)
Cumin 10	Emerald Green	83 ^{cd}	100 ^c
	Pink Allusio	83 ^{cd}	83 ^{bc}
	Berry Allusionmm	100 ^d	100 ^c
	Christmas	66 ^{bcd}	100 ^c
	Mini Pixie	50 ^{bc}	83 ^{bc}
Cumin 20	Emerald Green	0 ^a	75 ^{bc}
	Pink Allusio	83 ^{cd}	100 ^c
	Berry Allusionmm	100 ^d	100 ^c
	Christmas	50 ^{bc}	100 ^c
	Mini Pixie	50 ^{bc}	100 ^c
Cefazolin 100	Emerald Green	0 ^a	75 ^{bc}
	Pink Allusio	33 ^{ab}	50 ^{ab}
	Berry Allusionmm	83 ^{cd}	50 ^{ab}
	Christmas	100 ^d	0 ^a
	Mini Pixie	66 ^{bcd}	100 ^c

Means within each column sharing at least one common letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test.

یافته‌های این پژوهش نشان داد که پاسخ ارقام مختلف سیگونوم به تیمارهای ضدعفونی‌کننده (سفازولین و اسانس زیره) تفاوت معنی‌داری دارد که نشان‌دهنده اثر متقابل ژنوتیپ و ترکیب شیمیایی است. نتایج ما در مورد حذف کامل آلودگی باکتریایی در رقم 'Emerald Green' با استفاده از اسانس زیره، همسو با مطالعات اخیر در زمینه استفاده از متابولیت‌های ثانویه گیاهی است. ترکیبات فرار موجود در اسانس زیره سبز به ترتیب کومین‌آلدئید، پاراسیمن، گاماترپین و آلفاترپین ۷ - ال هستند که می‌توانند مانع از رشد نسبی باکتری‌های بیماری‌زا گردند. کومین‌آلدئید، دارای فعالیت ضدباکتریایی گسترده‌ای است که با تخریب غشای سیتوپلاسمی و نشت محتویات درون سلولی پاتوژن‌ها، سبب مرگ آن‌ها می‌شود (Paul et al., 2025; Darvishi et al., 2025). اسانس برخی از گونه‌های زیره ایران دارای ترکیب کومین‌آلدئید دارای پتانسیل ضدقارچی است (Askari et al., 2023). برای کنترل قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه فرنگی ناشی از *Phytophthora parasitica* با استفاده از اسانس‌های طبیعی مشخص گردید، زیره در غلظت ۱۸۰ پی‌پی‌ام از رشد ۵۰ درصدی قارچ نسبت به شاهد جلوگیری نمود (Ardestani et al., 2017). در این آزمایش با افزایش غلظت زیره میزان آلودگی باکتریایی در رقم‌های Christmas و Mini Pixie تا ۵۰ درصد نسبت به ارقام دیگر کاهش پیدا کرد. در رقم Emerald Green آلودگی باکتری با افزایش غلظت زیره به صفر درصد رسید. در پژوهشی حداقل غلظت بازدارندگی علیه باکتری‌ها بین ۰/۸۷ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (Abedi et al., 2022) که با نتایج این آزمایش همسو بود. آنتی‌بیوتیک سفازولین (از دسته سفالوسپورین‌های نسل اول) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کارایی بالایی در کنترل آلودگی‌های باکتریایی به‌ویژه در ارقام 'Emerald Green' و 'Pink Allusio' نشان داد. این یافته تأییدکننده گزارش‌های پیشین است که نشان می‌دهند سفازولین به دلیل داشتن طیف اثر وسیع بر باکتری‌های گرم‌مثبت و برخی گرم‌منفی‌ها، جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج است که اغلب سبب سمیت در گیاه (Phytotoxicity) می‌شوند (El-Banna et al., 2021). در کشت بافت موز با استفاده از سفازولین آلودگی باکتریایی کنترل شد (El-Banna et al., 2021). تا کنون هیچ مطالعه‌ای در رابطه با تاثیر سفازولین در کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی در شرایط درون شیشه‌ای برای گیاهان زینتی در دسترس نمی‌باشد اما نتایج این آزمایش نشان داد آنتی‌بیوتیک سفازولین بیشترین کنترل آلودگی باکتریایی در رقم Emerald Green (صفر درصد) و همچنین در رقم Christmas بیشترین کنترل آلودگی قارچی (صفر درصد) را داشت. تفاوت در میزان آلودگی قارچی بین ارقام، احتمالاً به تفاوت در ساختار بافت گیاهی، محتوای فنولی درونی و توانایی رقم در جذب و انتقال این ترکیبات در محیط کشت بازمی‌گردد. مشاهده شد که اسانس زیره در غلظت‌های مختلف تنها بر برخی پاتوژن‌های قارچی مؤثر بوده است؛ این امر نشان می‌دهد که در مدیریت آلودگی‌های قارچی، ممکن است نیاز به دوزهای بالاتر یا ترکیبات هم‌افزا (Synergistic) باشد تا خلل موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها (کیتین) بهتر مدیریت شود.

آزمایش چهارم- اثر گندزدایی ریز نمونه‌ها با استروپتومایسین، عصاره توتون و رقم بر پاتوژن‌های درون شیشه‌ای سینگونیم بر اساس جدول تجزیه واریانس اثر ساده ماده گندزدا بر آلودگی باکتریایی، قارچی و نکروز شدن ریزنمونه در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر ساده نوع رقم بر آلودگی قارچی (در سطح پنج درصد) و نکروز شدن ریزنمونه (در سطح پنج درصد) معنی‌دار بود. اثر متقابل ماده گندزدا و رقم بر صفات میزان آلودگی باکتریایی و نکروز شدن ریزنمونه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

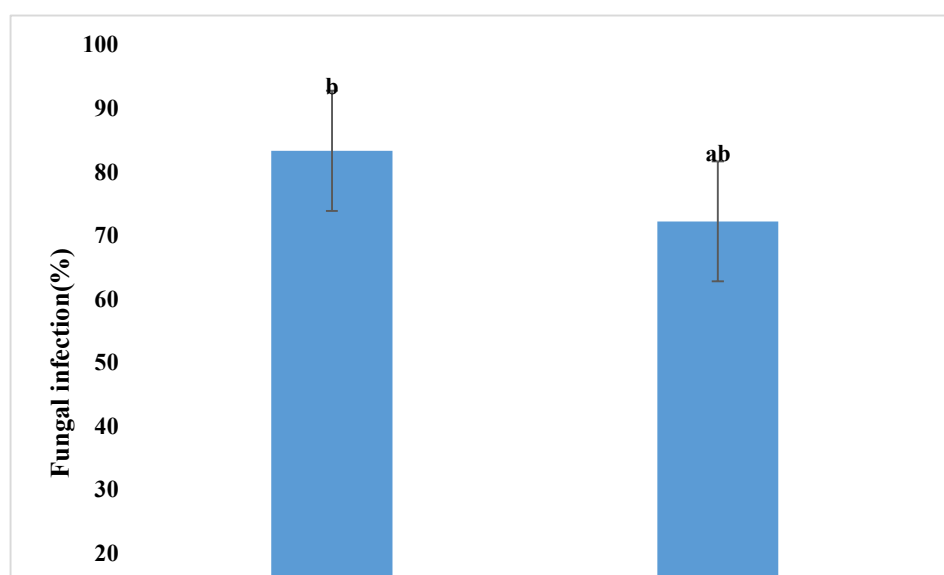
جدول ۴- تجزیه واریانس اثر ماده گندزدا و نوع رقم بر پاتوژن‌های درون شیشه‌ای و نکروز شده ریزنمونه سینگونیم

Table 4. Analysis of variance of the effect of disinfectant and variety type on in vitro and necrotic pathogens of *Syngonium* sp. explants

MS				
SOV	df	Bacterial infection	Fungal infection	Necrosis
Disinfectant agent	4	37**	53**	14**
Variety	2	0.38 ^{ns}	33*	36**
Disinfectant agent× Variety	8	18**	8 ^{ns}	14**
Error	30	5.4	4.6	1.8
CV(%)		27	30	28

ns: No significant, **: significant at $p < 0.01$

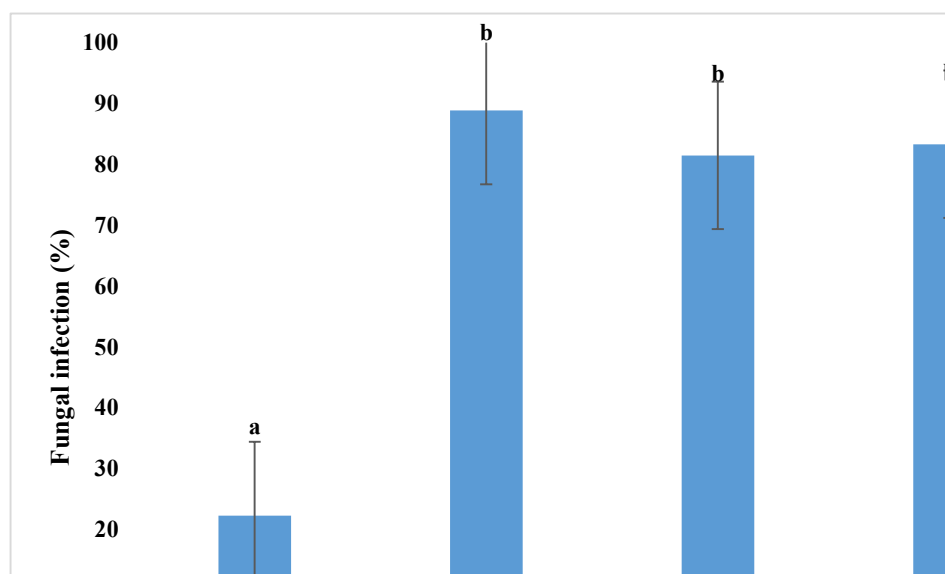
در بین ارقام مورد بررسی، رقم Christmas بیشترین میزان آلودگی قارچی (۸۳/۳۳ درصد) و رقم Emerald Green کمترین میزان آلودگی قارچی (۵۱/۱۱ درصد) را نشان دادند که با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند (شکل ۴-۵).



شکل ۵- اثر رقم بر میزان آلودگی قارچی ریزنمونه سینگونیم

Figure 5. Effect of variety on fungal contamination of *Syngonium* sp. explants

غوطه‌وری ریزنمونه‌های گره‌ای سینگونیم در زمان‌های مختلف استروپتومایسین و تنباکو سبب افزایش میزان آلودگی قارچی نسبت به شاهد شد. در روش متداول گندزدایی (شاهد) کمترین میزان آلودگی قارچی (۲۲/۲۲ درصد) مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۶).



شکل ۶ - اثر ماده گندزدا بر میزان آلودگی قارچی ریزنمونه سینگونیم

Figure 6. Effect of disinfectant type on fungal contamination of *Syngonium* sp. explants

همانگونه که در جدول ۵ نشان داده شده است، روش متداول گندزدایی سینگونیم در کنترل آلودگی باکتریایی تمام رقم‌ها کارآمد نبود و کاربرد آنتی‌بیوتیک استروپتومایسین و تنباکو در برخی زمان‌ها و برخی ارقام توانست سبب مهار این پاتوژن درون شیشه‌ای گردد. در رقم Christmas هیچ‌کدام از زمان‌های استروپتومایسین نتوانست میزان آلودگی باکتریایی را کاهش دهد ولی غوطه‌وری ریزنمونه‌های گره‌ای به مدت ۳۰ دقیقه در عصاره توتون به طور کامل سبب حذف آلودگی باکتریایی شد (صفر درصد). کاربرد زمان‌های مختلف غوطه‌وری در استروپتومایسین سبب کاهش جزئی آلودگی باکتریایی نسبت به شاهد شد ولی این کاهش معنی‌دار نبود و تنها در غوطه‌وری ۳۰ دقیقه توتون میزان آلودگی نسبت به شاهد ۷۵ درصد کاهش پیدا کرد و تفاوت نیز معنی‌دار بود. در بین ارقام مورد مطالعه، رقم Pink Allusio نسبت به مواد گندزدا حساس‌تر نسبت به سایرین به‌ویژه با اعمال روش گندزدایی متداول بود. در روش غوطه‌وری به مدت ۵ دقیقه در استروپتومایسین و ۳۰ دقیقه در عصاره توتون در همه ارقام هیچ‌گونه علایمی از نکروز شدن ریزنمونه مشاهده نشد (جدول ۵).

جدول ۵ - مقایسه میانگین اثر ماده گندزدا و رقم بر آلودگی های باکتریایی ریزنمونه سینگونیم

Table 5. Comparison of the average effect of disinfectant type and variety on bacterial contamination of *Syngonium* sp. explants

Disinfectant agent	Variety	Bacterial infection (%)	Fungal infection (%)
Control	Christmas	100 ^c	0 ^a
	Pink Allusio	100 ^c	100 ^b
	Emerald Green	100 ^c	0 ^a
Streptomycin 2 min	Christmas	100 ^c	0 ^a
	Pink Allusio	100 ^c	16.66 ^b
	Emerald Green	66.67 ^{bc}	0 ^a
Streptomycin 5 min	Christmas	100 ^c	0 ^a
	Pink Allusio	77.78 ^a	0 ^a
	Emerald Green	66.67 ^{bc}	0 ^{a b}
Streptomycin 10 min	Christmas	100 ^c	0 ^a
	Pink Allusio	83.33 ^c	16.66 ^b
	Emerald Green	83.33 ^c	0 ^a
Tobacco extract 30 min	Christmas	0 ^a	0 ^a
	Pink Allusio	25 ^{ab}	0 ^a
	Emerald Green	88.89 ^c	0 ^a

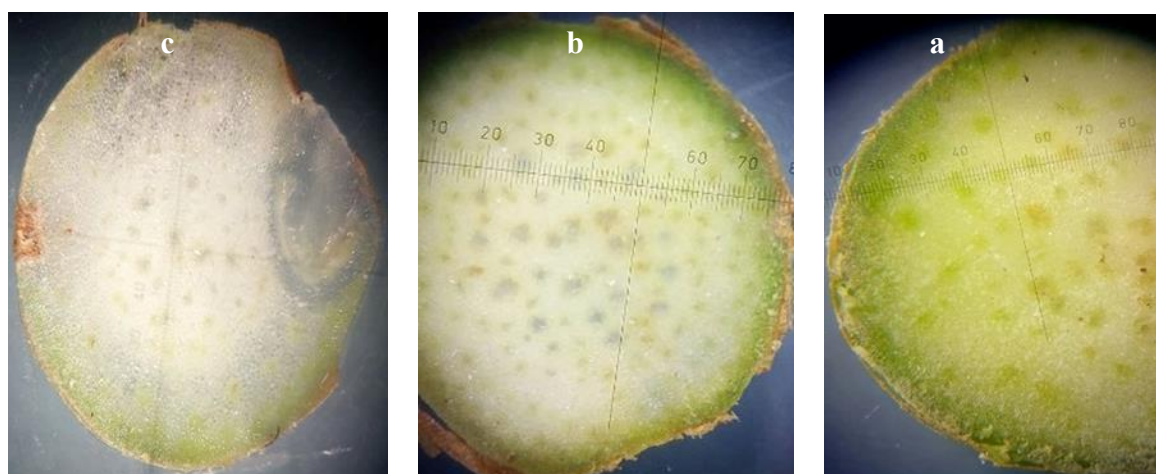
Means within each column sharing at least one common letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test.

از عوامل موثر در آلودگی ریزنمونه‌ها در طی کشت درون شیشه‌ای منشا ریزنمونه، روش و زمان جمع‌آوری ریزنمونه‌ها، نوع بافت گیاهی و مورفولوژی ریزنمونه‌ها و گونه گیاهی می‌باشد که این عوامل در میزان آلودگی اهمیت زیادی دارد (Rezazadeh et al., 2021). تفاوت در میزان آلودگی پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی در بین ارقام سینگونیوم بسیار مشهود بود. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان آلودگی قارچی و باکتریایی در ارقام مختلف سینگونیوم به‌طور معناداری متفاوت است. رقم 'Christmas' با بیشترین میزان آلودگی قارچی و رقم 'Emerald Green' با کمترین میزان، تفاوت‌های ساختاری قابل توجهی را نشان دادند (شکل ۷). رقم Emerald Green دارای ساقه‌های قطورتری نسبت به ارقام Christmas و Pink Allusio بودند و احتمالاً با داشتن لایه اپیدرمی ضخیم‌تر مقاومت بیشتری نسبت به نفوذ آلودگی‌های میکروبی نسبت به سایر ارقام داشته است. همچنین ارقام Christmas و Pink Allusio به‌دلیل رشد متراکم‌تر و نزدیکی به سطح خاک محتوای پاتوژن‌های درون‌زاد بیشتری نسبت به رقم Emerald Green داشتند. مطابق با یافته‌های ما، احتمالاً ضخامت لایه اپیدرمی و ویژگی‌های مورفولوژیک بافت در رقم 'Emerald Green' به عنوان یک سد فیزیکی عمل کرده و مانع از نفوذ مؤثر پاتوژن‌ها به بافت‌های داخلی شده است. این موضوع با گزارش‌های قبلی که تأکید دارند ساختار آناتومیک بافت گیاهی (مانند ضخامت دیواره سلولی و تخلخل اپیدرم) تعیین‌کننده میزان موفقیت پروتکل‌های گندزدایی است، همسو می‌باشد (Rezazadeh et al., 2021). همچنین، حساسیت بالای رقم 'Pink Allusio' به روش‌های گندزدایی متداول نشان‌دهنده حساسیت ژنوتیپی (Genotype-specific sensitivity) در پاسخ به تنش‌های شیمیایی است. مشاهده تفاوت در میزان کارایی گندزدایی بین ارقام مختلف می‌تواند ناشی از ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک متفاوت هر رقم باشد. تفاوت در ضخامت کوتیکول، تراکم روزنه‌ها یا حتی حضور ترشحات پلی‌ساکاریدی در سطح بافت می‌تواند میزان تماس و نفوذ ترکیبات فرار اسانس را تحت تأثیر قرار دهد. این تفاوت‌ها تأیید می‌کنند که پروتکل‌های گندزدایی در کشت بافت نباید به صورت یکسان برای تمامی ارقام اعمال شود و نیاز به بهینه‌سازی بر اساس ویژگی‌های هر ژنوتیپ وجود دارد (Tapily et al., 2025). یکی از یافته‌های مهم این مطالعه، مشاهده افزایش میزان آلودگی قارچی در برخی تیمارهای استرپتومایسین و عصاره توتون نسبت به شاهد بود. این پدیده می‌تواند ناشی از ایجاد تنش فیزیکیوشیمیایی بر بافت گیاه باشد که منجر به ایجاد ریزآسیب‌ها (Micro-lesions) در سطح اپیدرم شده و در نتیجه، مسیر ورود آسان‌تر پاتوژن‌ها به داخل بافت را فراهم کرده است. افزایش آلودگی در برخی تیمارها نشان می‌دهد تعامل بین ماده گندزدا و سطح بافت گیاه بسیار پیچیده است و نمی‌توان یک دستورالعمل واحد برای همه ارقام داشت. با این حال، این ترکیبات در کنترل پاتوژن‌های باکتریایی، نتایج بسیار نویدبخش بود.

آنتی‌بیوتیک استروپتومایسین به‌دلیل دامنه گسترده بودن روی بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در پژوهش‌های پاتولوژی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mohammadi et al., 2018). استروپتومایسین یک نوع آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است که مانند سایر آنتی‌بیوتیک‌های این گروه با انتقال فعال از غشای باکتری مانع بیوسنتز پروتئین‌ها توسط ریبوزوم می‌شود (Vance, 2015). استفاده از این آنتی‌بیوتیک جهت کنترل بیماری‌های باکتریایی گیاهی مانند *Pseudomonas cichorii* *Pectobacterium* spp *Xanthomonas campestris* گزارش شده است (Ramirez-Mora et al., 2019). این آنتی‌بیوتیک در زمان‌های زیاد غوطه‌وری سبب در ارقام Pink Allusio و Emerald Green تا حدودی سبب کاهش آلودگی باکتریایی بود ولی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. احتمالاً این امر به‌دلیل حساسیت متفاوت ارقام نسبت به آنتی‌بیوتیک بوده است. در این آزمایش غوطه‌وری ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در عصاره توتون به‌شدت آلودگی باکتریایی را در ارقام Christmas و Pink Allusio کاهش داد (صفر تا ۲۵ درصد).

با توجه به افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها در نتیجه‌ی استفاده‌ی بی‌رویه از ترکیبات ضد میکروبی، نیاز به یافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید و کارآمد بسیار حیاتی است. عصاره‌های گیاهی از جمله محصولات زیستی هستند که در این زمینه مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند؛ بنابراین امکان استفاده و جایگزینی آنها با ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی و از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها وجود دارد (Zolfaghari Ahangar et al., 2021). در رقم 'Christmas' که به شدت مستعد آلودگی باکتریایی بود، برخلاف استرپتومایسین، غوطه‌وری ۳۰ دقیقه‌ای در عصاره توتون توانست آلودگی باکتریایی را به‌طور کامل حذف کند. این کارایی فوق‌العاده عصاره توتون می‌تواند به حضور آلکالوئیدهای قوی

مانند نیکوتین نسبت داده شود. نیکوتین به عنوان یک سم عصبی در موجودات زنده، در باکتری‌ها با اختلال در عملکرد پروتئین‌های غشایی و سیستم‌های انتقال یونی عمل کرده و منجر به مرگ سلولی می‌شود. (Jadhav et al., 2025) کاهش ۷۵ درصدی آلودگی باکتریایی در اثر تیمار توتون نشان می‌دهد که عصاره‌های گیاهی می‌توانند به عنوان یک جایگزین بیولوژیک و کارآمد برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی، به‌ویژه در ارقام مقاوم به تیمارهای متداول گندزدایی، مورد استفاده قرار گیرند. Ahangar و همکاران (2011) اثرات آنتی‌باکتریایی عصاره توتون روی سوش-های باکتریایی *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* را بر کنترل آلودگی باکتریایی را اثبات کردند که نتایج این پژوهشگران با یافته‌های این آزمایش همسو است. عدم تاثیر مثبت عصاره توتون بر کنترل آلودگی باکتریایی رقم Emerald Green احتمالا به دلیل جذب کمتر این ترکیب توسط بافت‌های ساقه‌ای بوده است.



شکل ۷- مقطع عرضی ساقه رقم‌های: (a) Emerald Green, (b) Pink Allusio, (c) Christmas

Figure 7. Cross-section of the stem of the following varieties: (a) Emerald Green, (b) Pink Allusio, (c) Christmas

به‌طور کلی، نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که میزان آلودگی‌های درون شیشه‌ای شدیداً بستگی به رقم، روش گندزدایی و نوع ماده گندزدا دارد. بیشترین نوع آلودگی در شرایط کشت درون شیشه‌ای سینگونیم از نوع پاتوزن‌های باکتریایی بود که روش‌های متداول دو مرحله‌ای گندزدایی با اتانول و سفید کننده خانگی برای حذف آنها کارایی لازم را نداشت. کاربرد اسانس زیره به عنوان جزئی از محیط کشت در غلظت‌های کم (۲۰ میلی گرم در لیتر) توانست به‌طور کامل از رشد پاتوزن‌های باکتریایی ریزنمونه در رقم Emerald Green جلوگیری کند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اسانس زیره می‌تواند به عنوان یک جایگزین یا مکمل کارآمد برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج در مراحل اولیه گندزدایی گیاهان استفاده شود. این رویکرد نه تنها هزینه‌های تولید را کاهش می‌دهد، بلکه با کاهش وابستگی به مواد شیمیایی، فرآیند ریزازدیادی گیاهان را به سمت پایداری زیست‌محیطی سوق می‌دهد. همچنین آنتی‌بیوتیک سفازولین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نیز قادر به حذف پاتوزن‌های قارچی و باکتریایی در برخی ارقام سینگونیم در شرایط درون شیشه‌ای شود. سفازولین به عنوان یک ابزار قدرتمند در پروتکل‌های کشت بافت، به‌ویژه برای ارقام مقاوم‌تر به پاکسازی، توصیه می‌گردد. گندزدایی ریزنمونه‌های ساقه‌ای نیز با عصاره توتون به مدت ۳۰ دقیقه و سپس با اتانول و سفید کننده خانگی به‌طور کامل آلودگی‌های درون شیشه‌ای را کنترل نمود. این موضوع نشان می‌دهد که پروتکل پیشنهادی (۳۰ دقیقه غوطه‌وری در عصاره توتون) ضمن کارایی بسیار بالا در حذف باکتری‌ها، با بافت‌های حساس ارقام مختلف سازگاری دارد و برخلاف بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث آسیب فیزیکی به ریزنمونه‌ها نمی‌شود. بنابراین با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان اینگونه پیشنهاد کرد که با پیش-بینی نوع آلودگی‌های درون‌زاد (قارچ و یا باکتری) ریزنمونه گیاهان مختلف می‌توان از ترکیباتی مانند اسانس زیره و تنباکو برای گندزدایی به-عنوان روشی پایدار و دوست‌دار محیط زیست استفاده نمود. در نهایت، لازم به ذکر است که این مطالعه با وجود دستاوردهای خود، محدودیت‌هایی نیز داشت؛ از جمله عدم شناسایی دقیق عوامل میکروبی مولد آلودگی‌ها در محیط کشت و محدودیت نتایج به ارقام و شرایط

آزمایشی خاص مورد بررسی که پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی مورد توجه قرار گیرند. پیشنهاد می‌شود در پروتکل‌های تولید انبوه سینگونیم، بسته به رقم مورد نظر، ترکیبی از عصاره‌های گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شود.

References

منابع

- Abedi, T., Asefi, N., Hanifian, S., & Dehghani, S. (2022). Inhibitory effect of Carum copticum, Rosa damascene mill, Anethum graveolens and Cuminum cyminum essential oils on some food-borne microbes. Food Hygiene, 11(4), 3144. doi: 10.30495/JFH.2022.1950877.1343 (In Persian)
- Ahmadpoor, F., Zare, N., Asghari, R. and Sheikhzadeh, P. (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in vitro cultures *Melia azedarach* L. AMB Express, 12(1), 3. doi:10.1186/s13568-022-01343-8
- Al-Mayahi, A. M., Ahmed, A. N., & Al-Khalifa, A. A. (2010). Isolation and identification of associated Fungal with the micropropagation of five different date palm cultivars and the effect of Benlate Fungicides in their control. Basrah Journal of Date Palm Research, 9(2), 79-97.
- Altan, F., & B r n, B. (2010). Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. African Journal of Biotechnology, 9(7), 991-995. doi: 10.5897/AJB08.090
- Ardestani, Z., Shahriari, D., & Maleki, M. (2017). The antifungal effect of some herbal essences on the causal agent of tomato and crown root rot, *Phytophthora parasitica* L. in vitro and greenhouse conditions. Applied Plant Protection, 5(4), 191-201.
- Askari, F., Sefidkon, F., Allahverdi Mamaghani, B. (2023). 'Efficiency of medicinal and aromatic plants' essential oil for producing antimicrobial products', Iran Nature, 8(1), 57-71. doi: 10.22092/irn.2023.359190.1471 (In Persian)
- Belal, A.A., Ahmed, F.B., & Ali, L.I. (2017). Antibacterial Activity of Cuminum Cyminum L. Oil on Six Types of Bacteria to cite this article. American Journal of BioScience, 5(4), 70-73. Doi:10.11648/j.ajbio.20170504.12
- Bown, D. (2000). Aroids: Plants of the Arum family (2nd ed.). Timber press.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International journal of food microbiology, 94(3), 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Cardoso, J.C., Sheng, Gerald, L.T., & Teixeira da Silva, J.A. (2018). Micropropagation in the twenty first century. Plant cell culture protocols, 17-46. doi: 10.1007/978-1-4939-7750-1_2
- Chen, J.J., Henny, R.J., & Chao, C.T. (2003). Somaclonal variation as a source for cultivar development of ornamental aroids. Recent Research Developments in Plant Science, 1, 31-43.
- Chen, J.J., Henny, R.J., Devanand, P.S., & Chao, C.T. (2006). AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants. Plant Cell Reports, 24, 743-749. doi: 10.1007/s00299-005-0045-2
- Darvishi, F., Moosavi-Nasab, M., Khoshnoudi-Nia, S. & Oliyai, N. (2025). Preservative effects of cumin (*Cuminum cyminum*) and black zira (*Bunium persicum*) essential oil emulsion-based gelatin coating on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Journal of Food Science and Technology, 60(1), p.vvae015. doi:10.1093/ijfood/vvae015
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., & Pandian, S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. Journal of Ethnopharmacology, 130(1), 107-115. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.042
- El-Banna, A.N., El-Mahrouk, M.E., Dewir, Y.H., Farid, M.A., Abou Elyazid, D.M. & Schumacher, H.M. (2021). Endophytic bacteria in banana in vitro cultures: Molecular identification, antibiotic susceptibility, and plant survival. Horticulturae, 7(12), 526. doi:10.3390/horticulturae7120526
- Hakim, L., & Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant in vitro propagation: a comprehensive review. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1115(1), 012051. doi: 10.1088/1755-1315/1115/1/012051
- Hassan, H.A., Genaidy, M.M., Kamel, M.S., & Abdelwahab, S.F. (2020). Synergistic antifungal activity of mixtures of clove, cumin and caraway essential oils and their major active components. Journal of Herbal Medicine, 24, 100399. doi: 10.1016/j.hermed.2020.100399
- Henny, R.J. (1998). Culture and Breeding. Horticulture Reviews, 10, 1-33. doi: 10.1002/9780470650418.ch1
- Henny, R.J., and Chen, J. (2008). Tropical Foliage Plant Development: Origin of New Cultivars. Edis, 2, 466-472. doi: 10.32473/edis-fp335-2008
- Herath, H., Perera, P. & Millagasanga, M. (2025). Effect of Clove (*Syzygium aromaticum*) as a Disinfectant in Tissue Culture Media and Its Toxicity on Cultured Explants. In Proceedings of 23rd Agricultural Research Symposium, Vol. 1, p. 5.
- Hoque, M.M., Rattila, S., Shishir, M.A., Bari, M.L., Inatsu, Y., & Kawamoto, S. (2011). Antibacterial activity of ethanol extract of betel leaf (*Piper betle* L.) against some food borne pathogens. Bangladesh Journal of Microbiology, 28(2), 58-63.
- Jadhav, R., Chauhan, P., Singh, V.P. & Kumar, S. (2025). Alkaloids: Potent Defenses Against Plant Pathogens. Plant Secondary Metabolites: Natural Defenses in Disease Management. 1st Edition. CRC Press. Doi:10.1201/9781003442333
- Jamil, A.S., Assiry, A.M., Shaker, M.A., & Hamid, M.E. (2014). In vitro anti-yeast activity of chloramphenicol: A preliminary report. Journal Journal de mycologie medicale, 25(1), 17-22. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.10.004

- Kneifel, W., & Leonhardt, W. (1992). Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 29, 139-144. doi: 10.1007/BF00040512
- Leifert, C., Ritchie, J.Y., & Waites, W.M. (1991). Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 452-469. doi: 10.1007/BF00715664
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., & Jones, A.L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 443-465. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.120301.092104
- Mohammad, A., Molavi, F., & Dolatabadi, S. (2022). Investigating the synergistic effect of silver nanoparticles and streptomycin antibiotic on the expression of MexX gene of the efflux pump system in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 30(2), 41-50. (In Persian)
- Mokhtari, A., Khosravi, A., & Zahrani Salehi, T. (2012). Study of the antifungal effect and morphological changes of cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil on *Fusarium verticillioides* isolated from Iran. *Comparative Pathobiology*, 9(2), 705-714. (In Persian)
- Naeimi, Sh., Dolatabadi, Pourali, & Parastoo (2015). Investigating the antibacterial effect of gold nanoparticles produced by *Fusarium Oxysporum* attached to streptomycin antibiotic. *Neyshabur Medical Sciences Journal*, 4(2), 9-21. (In Persian)
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Quiagg, A., Santschi, P.H., & Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and Fungal. *Ecotoxicology*, 17, 372-386. doi: 10.1007/s10646-008-0207-1
- Oroojalian, F., Kasra-kermanshahi, R., Azizi, M., & Bassami, M.R. (2010). Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 120(3), 765-770. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.044
- Paul, A., Mishra, S.S., Maji, A., Samanta, A., Nahar, S. & Maity, T.K. (2025). Exploring the therapeutic potentials of cuminaldehyde: a comprehensive review of biological activities, mechanisms, and novel delivery systems. *Phytochemistry Reviews*, 24(6), 5207-5238. doi:10.1007/s11101-025-10069-x
- Reed, B.M., Buckley, P.M., & DeWilde, T.N. (1995). Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 31, 53-57. doi: 10.1007/BF02822625
- Rezazadeh, B., Ghasghari, A., Pourbeirami, & Haghjooyan, R. (2021). Study of different disinfection treatments on blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) micro-shoots. *Plant Research Journal (Iranian Journal of Biology)*, 34(1), 82-94. (In Persian)
- Rout, G.R., Mohapatra, A., & Jain S.M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24(6), 531-560. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.06.003
- Shahryari, A., Bagheri, A., Sharifi, A., & Mashtaghi, N. (2011). Control of micro-sample contamination of *Alstroemeria* (*Alstroemeria* sp.) rhizomes under in vitro conditions. *Horticultural Science Journal*, 25(1), 109-115. (In Persian)
- Shirvany, A., Rezayan, H., & Alvandi, H. (2021). Preparation and Evaluation of a Niosomal Drug Delivery System Containing Cefazolin and Study of Its Antibacterial Activity. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 15(6), 638-657. doi:10.30699/ijmm.15.6.638
- Singh, N., Yadav, S.S., Kumar, S. & Narashiman, B. (2021). A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and clinical research of dietary spice *Cuminum cyminum* L. *Phytotherapy Research*, 35(9), pp.5007-5030. doi: 10.1002/ptr.7133
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182. doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.012
- Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G., & Tubaro, A. (2002). Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(2), 211-215. doi: 10.1016/S0378-8741(02)00124-1
- Srichana, D., Phumruang, A., & Chongkid, B. (2009). Inhibition effect of betel leaf extract on the growth of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Science and Technology Asia*, 74-77.
- Taghizadeh, M., & Solgi, M. (2014). The Application of Essential Oils and Silver Nanoparticles for Sterilization of Bermudagrass Explants in in Vitro Culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(2), 131-140. doi: 10.22059/ijhst.2014.52445
- Taghizadeh, M., Mirabootalebi, Z. S., & Komeijani, M. (2022). Investigating the effectiveness of natural and chemical antimicrobial compounds in controlling *Solanum tuberosum* L. *in vitro* pathogens. *Journal of Biotechnology*, 16(3), 57-71. (In Persian)
- Tapily, E.H.H., Kouassi, K.M., Kouassi, M.K., Seka, J.S.S., Tiendrébéogo, F. & Pita, J.S. (2025). Enhancing In Vitro Regeneration in Three Sweet Potato Genotypes: Interplay Between Disinfectant, Explant Age, and Genotype. *Biotechnology journal*, 14(3), 63. doi: 10.3390/biotech14030063
- Zeynalabedini, M., Shirazi, R.J., & Ardebili, N. (2012). The effect of plant growth regulators and explant type on in vitro shoot proliferation of *Satureja bachtiarica* Bunge. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 653-661. doi:10.22037/ijpr.2012.1102008
- Zolfaghari Ahangar, Z., Nourastehnia, A., Mahdipour, M.J., & Sarmad, J. (2012). Study of antimicrobial effects of tobacco extract (*Nicotiana tabacum* L) under hydroponic culture conditions. *Masters Thesis. Ministry of Science, Research and Technology, University of Guilan, Faculty of Basic Sciences.* (In Persian)
- Zolfaghari, S., Amiri, M., & Khosravi, S. (2015). Antibacterial activity of some Iranian medicinal plants on common food-borne pathogens. *Journal of food science and technology*, 52(8), 5146-5152. doi: 10.1007/s13197-013-1098-3
- Zulhijri, A., Mulyaningsih, T., & Pratami, D.P. (2021). The effect of plant growth regulators on the growth and development of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 718(1), 012-015. doi: 10.1088/1755-1315/718/1/012015