تاثیر استفاده از آنتی اکسیدان در محیط کشت به منظور کنترل فنل و افزایش استقرار ریزنمونه‌های پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱

سیدرضا نظامی[۱]، عباس یداللهی[۲،*]، حسین حکم‌آبادی[۳]، سمیه اکبری‌پور[۱]

۱و۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران. ۳- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی سمنان (شاهرود)، ایران.

*نویسنده مسئول:yadollah@modares.ac.ir

چکیده

تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از اکسیداسیون ترکیبات فنلی و کنترل قهوه‌ای شدن بافت و محیط کشت مشخص است. به منظور بررسی تاثیر آنتی‌اکسیدان بر کنترل فنل و اکسیداسیون ریزنمونه‌های پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱ در شرایط درون‌شیشه‌ای از غلظت‌های مختلف دونوع آنتی‌اکسیدان سیتریک‌اسید (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم برلیتر) و آسکوربیک‌اسید (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر) در دونوع محیط کشت MS و DKW به همراه ویتامین‌های گمبورگ و ۳درصد ساکارز و ۶/۲ گرم بر لیتر آگارز استفاده گردید. در پایان نتایج نشان داد استفاده ترکیبی از دونوع آنتی اکسیدان در محیط کشت MS بیشترین تاثیر را درکنترل فنل داشت ولی استفاده از ۱۵۰ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید به تنهایی در محیط کشت با توجه به افزایش میزان باززایی و کاهش زردی انتهایی، بهتر از تیمارهای ترکیبی است.

کلمات کلیدی: کنترل فنل، آنتی‌اکسیدان، کشت درون‌شیشه‌ای، پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱، MS، DKW

مقدمه

کشت بافت گیاهان چوبی همواره به موجب مشکلاتی چون تولید فنل و قهوه‌ای شدن محیط با سختی‌هایی روبرو بوده است (Krishna and Singh, 2007). به همین منظور تاکنون تحقیقات زیادی مبنی برکنترل فنل صورت گرفته است. تولید فنل تحت تاثیر عوامل درونی و بیرونی کنترل می‌گردد که هریک ازاین عوامل دارای مکانیسم‌های پیچیده‌ای هستند، به طوریکه تاکنون مکانیسم‌های زیادی برای تولید و قهوه‌ای شدن ترکیبات فنلی ارائه گردیده است که شناخت مکانیسم هریک ازاین عوامل میتوانددر کنترل تولید و ترشح و قهوه‌ای شدن بافت‌ها به شدت موثر باشد. اگرچه روش‌های کارآمدی برای کنترل تولید و ترشح فنل تاکنون گزارش گردیده است ولی همچنان کنترل آن یکی از معضلات پیش‌روی محققیق می‌باشد. یکی از مشکلات معمول که در استقرار ریزنمونه‌های چنین گیاهانی وجود دارد اکسیدشدن ترکیبات فنلی می‌باشد (Khatri et al., 1997). انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور تعدیل تولید فنل در کشت درون شیشه‌ای پسته استفاده می‌شود که مهمترین آنها آسکوربیک‌اسید می‌باشد. اُنای (۲۰۰۰) از ۱۱۴µM آسکوربیک‌اسید درون محیط کشت به منظور کنترل فنل در کشت جوانه انتهایی درختان بالغ پسته استفاده نمونند. همچنین در گزارشی مشابه به منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه و محیط کشت از ۰/۰۱ درصد آسکوربیک اسید در محیط کشت استفاده نمود (Garcia et al., 2011).

مواد و روش‌ها

به منظور کنترل ترکیبات فنلی و کاهش زردی ریزنمونه‌های پایه رویشی UCB1 (P. integrima × P. atlantica)، این آزمایش به صورت فاکتوریل (با ۳ فاکتور) بر پایه طرح کامل تصادفی با ۳۲ تیمار و ۲۰ تکرار و هرتکرار شامل ۵ ریزنمونه تک گره در

آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. فاکتورهای مورد مطالعه در این آزمایش شامل ۲ سطح محیط کشت (MS و DKW)، چهار سطح آسکوربیک‌اسید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، چهار سطح سیتریک‌اسید (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش از جوانه‌های جانبی گیاهان مادری پایه رویشی پسته UCB1 رشد کرده در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی تربیت مدرس تهیه گردید ضدعفونی نیز طبق روش توصیف شده توسط نظامی وهکاران (۱۳۹۴) انجام گردید. صفات مورد مطالعه در این آزمایش شامل درصد نمونه‌های باززایی شده (استقرار) ، درصد زنده‌مانی جوانه (عدم ترشح فنل) و درصد سوختگی انتهایی جوانه بازشده بود. پس از انجام آزمون نرمالیته و نرمال سازی، داده‌ها حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و توسط همین نرم‌افزار و با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD)، مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایشات حاکی از آن بود که تاثیر نوع محیط کشت و همچنین نوع و غلظت آنتی اکسیدان و همچنین برهمکنش بین محیط و غلظت‌های مختلف هردونوع آنتی‌اکسیدان نیز بر میزان باززایی معنی‌دار گردید (در سطح کمتر از یک درصد). تفاوت آماری معنی‌داری بین محیط کشت MS و DKW بر میزان ریزنمونه‌های فاقد فنل و باززایی ریزنمونه‌های یوسی‌بی۱ مشاهده گردید ولی تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت در میزان زردی و سوختگی ریزنمونه‌های باززایی شده وجود نداشت. استفاده توام انواع محیط کشت و غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان نشان داد که اگرچه استفاده از محیط کشت MS به همراه ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک‌اسید و ۱۰۰ میلی‌گرم سیتریک‌اسید منجر به کمترین میزان آلودگی فنلی (۲۵ درصد) گردید ولی میزان باززایی در را کاهش داد به همین منظور استفاده از محیط MS به همراه ۱۵۰ میلی‌گرم آسکوربیک اسید بدون استفاده استفاده از سیتریک اسید داشت و علاوه بر کنترل ۶۰ درصدی فنل منجر به نرخ باززایی بالاتر نسبت به تیمار قبل (MS + ۱۵۰ میلی‌گرم آسکوربیک اسید+ ۱۰۰ میلی‌گرم سیتریک‌اسید) گردید. بیشترین میزان باززایی (۲۳ درصد) مربوط به محیط کشت MS و کمترین آن در محیط DKW حاصل شد که ۱۹درصد باززایی در آن حاصل گردید. کاربرد ترکیبی محیط‌کشت‌های مختلف با غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان حاکی ازآن بود که استفاده از محیط کشت MS به همراه ۱۵۰ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید و بدون استفاده از سیتریک‌اسید بیشترین باززایی (۵۹ درصد) را نشان داد و کمترین نرخ باززایی (۵ درصد) مربوط به محیط DKW به همراه ۷۵ میلی‌گرم سیتریک‌اسید و بدون استفاده از آسکوربیک‌اسید بدست آمد. نتایج حاکی ازآن بود که با افزایش غلظت آسکوربیک اسید میزان سوختگی جوانه‌ها افزایش نشان داد و بیشترین کلروزه شده انتهایی جوانه‌های باززایی شده مربوط به بالاترین غلظت مورد استفاده بود. همچنین استفاده از ۷۵ میلی‌گرم سیتریک اسید منجر به بیشترین کلروزه شدن گردید. هنگامی که از تیمارهای ترکیبی استفاده گردید، نتایج نشان داد که بیشترین (۷ درصد) میزان نکروزه‌شدن مربوط به تیمار محیط کشت MS+ ۱۵۰ میلی‌گرم آسکوربیک‌اسید + ۷۵ میلی‌گرم سیتریک‌اسید بود و کمترین (۰ درصد) میزان نکروزه شدن غلظت‌های پایین‌تر یا فاقد آنتی-اکسیدان بدست آمد.

بحث

ترشح ترکیبات فنلی یکی از عوامل کاهش موفقیت در ریزازدیادی پسته محسوب می‌شود. ترشح و اکسیداسیون ترکیبات فنلی از بافت‌های آسیب‌دیده و همچنین از آوند ریزنمونه‌ها منجر به ایجاد ترکیبات دیگر از جمله کینون‌ها می‌گردد. استفاده از آنتی-اکسیدان‌ها، غوطه‌وری درون آب مقطر دوبار استریل بعد ازاستریل کردن، غوطه‌وری درون محلول آنتی اکسیدان به صورت قبل و بعد از استریل کردن (Nezami et al., 2015c) استفاده از ترکیبات جذب کننده ترکیبات فنلی مانند زغال فعال (Jafarkhani et al., 2009)و پلی‌وینیل‌پایریلیدون، تغییر غلظت عناصر محیط کشت پایه (Nezami, et al., 2015a)، کاهش غلظت ساکارز،

استفاده از آب جاری(Zamir et al., 2007; Bon et al., 1988)، تاریک‌دهی واتیوله کردن نهال مادری (Nezami, et al., 2015b)، تلقیح گیاه مادری با قارچ مایکوریزا به منظور کاهش تنش(Krishna, and Singh, 2008) . ودرنهایت قرار دادن ریزنمونه کشت شده در محیط تاریک و یا با دمای پایین از اقدامات کنترل تولید و ترشح ترکیبات فنلی می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها با جلوگیری از عمل این آنزیم‌ها از تولید ترکیبات اکسیدشده جلوگیری می‌کند و بدین صورت از مرگ ریزنمونه‌ها جلوگیری می‌کند. نتایج آزمایش‌های ما حاکی ازآن بود که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها تاثیر مثبتی برکنترل اکسیداسیون ترکیبات فنلی ریزنمونه‌های پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱ گذاشت به طوری‌که اضافه کردن ۱۵۰میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک‌اسید به محیط کشت پایه MS منجر به جلوگیری از سوختگی حاصل از اکسیداسیون ترکیبات فنلی گردید. افزایش غلظت آنتی‌اکسیدانی منجر به بهبود کنترل فنل گردید ولی افزایش بیش‌از حد ترکیبات فنلی می‌تواند تاثیر منفی در باززایی و پرآوری داشته باشد بگذارد که این موضوع با نتایج آزمایشات تیلکات وهمکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۱۳) مطابقت داشت که اظهار داشتند استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک اسید و سیتریک‌اسید درمحیط کشت بعداز اتوکلاو، تنها ۱۰ و ۱۵ درصد کاهش قهوه‌ای شدن را باعث شد (به ترتیب) و می‌تواند منجر به زردی و کاهش باززیی گردد. ریزازدیادی هلو می‌تواند با اضافه کردن ۵۰ میلی‌گرم برلیتر آسکوربیک‌اسید و ۲۰ میلی‌گرم‌برلیتر ویتامین استیب به صورت موفقیت‌آمیزی صورت پذیرد (Miller et al., 1982). نتایج آزمایشات حاکی ازآن است که استفاده از آسکوربیک‌اسید اثربخشی بالایی در حل مشکل قهوه‌ای شدن و مرگ ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای موز دارد. آنها معتقدند که آسکوربیک اسید در اثر جذب و انتقال به برگ، مانع از اکسیداسیون ترکیبات فنلی در محل هدف می‌شود (Nicholson, and Hammerschmidt, 1992). گزارشات نشان می‌دهد که مرحله ابتدایی ریزازدیادی سیب به‌خاطر ترشح ترکیبات فنلی دشوار است ولی با استفاده از تیمارترکیبی اسیدسیتریک و آسکوربیک‌اسید قابل کنترل است. استفاده از آسکوربیک‌اسید و ۴- هِگزیل‌ریسورسینول نتوانست به طور مستقیم برروی پلی‌فنل‌اکسیداز تاثیر داشته باشد اما باکاهش اکسیداسیون محیط و ریزنمونه، مانع قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های گلابی گردید (Arias et al., 2007).

منابع

۱. نظامی، س. ر.، یداللهی، ع.، حکم‌آبادی، ح. و سجادی سنجانی، ف. س. (۱۳۹۴). بهبود رفع آلودگی قارچی و باکتریایی در ریزنمونه‌های پایه رویشی پسته یوسی‌بی ۱. همایش بین‌المللی پژوهش‌های کاربردی در کشاورزی. ۲۲۳ ص.

2. Arias, E., J. Gonzalez, R. Oria and P.L. Buesa, 2007.Ascorbic acid and 4-hexylresorcinol effects on Pear PPO and PPO Catalyzed browning reaction. Food Chemistry and Toxicology, 72: 422-429.

3. Compton, M.E. and J.E. Preece, 1986. Exudation and explant establishment. NS Int Assn Plant Tissue Cult, 50: 9-18.

4. Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Traore, A.S., Laane, C., Berkel, W.J.H.V., Voragen, A.G.J., 2002. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. J. Agric. Food Chem. 50, 3780–3788.

5. Khatri, A, I.A. Khan, S.H. Siddiqui, M. Ahmed and K.A. Siddiqui, 1997. In vitro culture of indigenous and exotic banana clone for maximizing multiplication. Pak. J. Bot., 29: 143-150.

6. Krishna, H. and S.K. Singh, 2008. Biotechnological advances in mango (Mangatera indica L.) and their future implication in crop improvement. A review. Biotechnol Adv., 25: 223-243.

7. Miller, G., D. Coston, E. Denny and M. Romeo, 1982. In vitro propagation of 'Nema-guard peach rootstock. HortScience, 17: 194.

8. Monaco, L.C., C.R. Lopes and M.L. Carelli, 1977.Isomeros deacido chloregenico em species de coffea.Ciencia, Recife, 26: 240.

9. **Nezami S.R., A. Yadollahi, H. Hokmabadi**, 2015b, Control of Phenolic exudation and Improvement establishment of Pistachio explants whit Apical bud in In vitro condition, First International and 9th National Biotechnology Congress, Tehran, Iran.

10. Nicholson, R. L . and R. Hammerschmidt, 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annu Rev Phytopathol., 30: 369-389.

11. Tilkat E., V. Süzerer, H. Akdemir, E. A. Tilkat, Y.Özden Çiftçi and A. Onay, 2013, A rapid and effective protocol for surface sterilization and in vitro culture initiation of adult male pistachio (Pistacia vera L. cv. "Atlı"), Academia Journal of Scientific Research 1(8): 134-141.

The effect of antioxidants in the medium to control of phenol oxidation and increase of Pistachio rootstock UCB-1explants establishment

S. R. Nezami[1], A. Yadollahi[2]*, H. Hokmabadi[3], S. Akbaripour[1]

1- MS_c student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 2-Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 3- Scientific Member of Semnan (Shahrood) Agricultural Research Center, Iran.

*Corresponding author: yadollah@modares.ac.ir

Abstract

The effect of antioxidants on preventing the oxidation of phenolic compounds and controling plant tissue and culture medium browning has been well-known. In order to evaluate the effect of antioxidant on phenolic oxidation and control of phenolic browning in UCB-1 pistachio rootstock explants in in vitro conditions ,different concentrations of two types of antioxidants, citric acid (0, 25, 50 and 75 mgl^{-1}) and ascorbic acid (0, 50, 100 and 150 mgl^{-1}) in two different basal media of DKW (Driver and Kuniyuki,1984) and MS (Murashige and Skoog, 1962) with Gamborg vitamins,3% sucrose and 6.2 gl^{-1} agar were used. The results showed that the combination of two types of antioxidants in MS medium was most effective in controlling of phenolic browning; but the use of 150 mg/l ascorbic acid alone in the medium, leaded to increased regeneration rate and reduced shoot tip necrosis, so it would be better than the combined treatment.

Key word: Control of phenol, Antioxidant, in vitro, UCB-1, MS medium, DKW medium,