تاثیر غوطه‌وری بعد از استریلیزاسیون و زغال فعال در کنترل ترکیبات فنلی در کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه-های پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱

سیدرضا نظامی[۱]، عباس یداللهی[۳،*]، حسین حکم‌آبادی[٤]، سعادت ساریخانی- خرمی[۲]، سمیه اکبری‌پور[۱]

۲،۱ و۳به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دکتری و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران۰۴- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی سمنان (شاهرود)، ایران۰

*نویسنده مسئول: yadollah@modares.ac.ir

چکیده

استفاده از پایه‌های اصلاح‌شده درختان میوه می‌تواند تاثیر زیادی در افزایش تولید وارزآوری داشته باشد. استفاده از پایه یوسی-بی-۱ منجر به افزایش باردهی می‌گردد لذا تکثیر این پایه در کشور می‌تواند تاثیر زیادی در اقتصاد کشور داشته باشد. ترشح ترکیبات فنلی از محدودیت‌های تکثیر درون‌شیشه‌ای این پایه محسوب می‌شود لذا به منظور کنترل فنل آزمایشی با ۴۸ تیمار طراحی گردید. در طی آن ریزنمونه‌ها درون غلظت و زمان‌های مختلف آسکوربیک‌اسید غوطه‌ور شدند. همچنین به منظور بهبود پروتکل و استقرار از غلظت‌های مختلف زغال فعال در محیط کشت پایه MS استفاده شد. درنهایت نتایج حاکی از آن بود که استفاده ازتیمار ۱ گرم‌برلیتر زغال به همراه غوطه‌وری ریزنمونه‌ها درون محلول ۱۵۰ میلی‌گرم‌برلیترآسکوربیک‌اسید به مدت ۲ ساعت بیشترین تاثیر را درکنترل فنل و استقرار نشان داد و ۸۰ درصد از ریزنمونه‌ها فاقد هرگونه ترشح فنل بوده و۶۶ درصد از آنها، استقرار یافتند.

کلمات کلیدی: کنترل فنل، زغال فعال، غوطه‌وری بعد از استریلیزاسیون، آسکوربیک‌اسید، پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱، MS

مقدمه

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). کشت درون‌شیشه‌ای پسته همواره به خاطر تولید و ترشح ترکیبات فنلی، همواره با مشکلاتی روبرو است و در واقع مشکل اصلی در ریزازدیادی پسته ترشح ترکیبات فنلی ودرادامه اکسیداسیون آنها و مرگ ریزنمونه است. آسیب ریزنمونه‌ها در طی کلیه مراحل، منجر به زخمی شدن سلول‌ها و تولید و ترشح فنل می‌گردد. همچنین به نظر می‌رسد مواد ضدعفونی کننده مانند قارچ‌کش‌ها، هیپوکلریدسدیم و کلریدجیوه منجر به ترشح و تولید فنل در طی روزهای ابتدایی استقرار می‌گردند. به احتمال زیاد موادضدعفونی کننده باعث آسیب بافت‌ها و ترشح ترکیبات فنلی گردند. یکی از مراحل ضروری در طی آماده کردن ریزنمونه به منظور کشت، ترمیم بافت‌های آسیب دیده می‌باشد ولی آنچه که مشخص است غوطه وری ریزنمونه‌ها قبل از استریلیزاسیون منجر به ترمیم حاصل از برش و تهیه ریزنمونه می‌گردد و تاثیری بر کاهش اثرات حاصل از مواد ضدعفونی کننده نمی‌گذارد. لذا غوطه‌وری مجدد ریزنمونه‌ها درون محلول آنتی اکسیدانتی ضروری به نظر می‌رسد. ولی آنچه که مسلم است غوطه‌وری مجدد درون محلول آنتی اکسیدانی می‌تواند منجر به عدم بازشدن جوانه‌ها و کاهش قدرت باززایی در مراحل بعدی گردد. زغال فعال یکی ازترکیباتی است که به منظور جذب ترکیبات فنلی به محیط کشت اضافه می‌گردد. زغال فعال دارای شبکه بسیار عالی از منافذ با مساحت سطح

داخلی بالا که امکان جذب مواد را درون منافذ خود فراهم می‌کند (Budavari, 1996; Mattson and Mark, 1971). زغال فعال به خاطر دارا بودن سطح فوق الاده بزرگ، منافذ بسیار و حجم منحصر به فرد آن در ظرفیت جذب حائز اهمیت است (Baker et al., 1992). علاوه بر این از زغال فعال هم درمحیط کشت‌های مایع و نیمه جامد به رسمیت شناخته شده است و به‌خاطر جذب مواد بازدارنده (Fridborg et al., 1978; Horner et al., 1977; Theander and Nelson, 1988; Weatherhead et al., 1978) و کاهش شدید در اکسیداسیون فنلی و یا تجمع ترشحات قهوه‌ای (Carlberg et al., 1983; Liu, 1993;) در محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. زغال فعال تمایل بیشتری برای جذب ترکیبات آلی قطبی مانند ترکیبات معطر مانند فنل‌ها دارد (Yam et al., 1990). که زغال فعال علاوه بر جذب ترکیبات فنلی تاثیر بسزایی درغیرفعال کردن فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز دارد (reviewed by Pan and Van Staden 1998). به همین منظور احساس می‌شود استفاده از ترکیبات فنلی می‌تواند نقش مفیدی در کنترل یا تعدیل میزان فنلی شدن محیط داشته باشد به طوریکه استفاده از ۰/۳ درصد زغال فعال در محیط استقرار منجر به کنترل زردی در کشت درون شیشه‌ای پسته می‌شود (Safari et al., 2013).

مواد و روش‌ها

به منظور کنترل تولید و ترشحات ترکیبات فنلی و همچنین رفع مشکلات حاصل از ضدعفونی ریزنمونه‌های پایه رویشی UCB1 (P. integrima × P. atlantica)، آزمایشی به صورت فاکتوریل (با ۴ فاکتور) بر پایه طرح بلوک تصادفی با ۴۸ تیمار و ۱۵ تکرار و هرتکرار شامل ۴ ریزنمونه در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. فاکتورهای مورد مطالعه در این آزمایش شامل ۴ سطح زغال فعال (صفر، ۱، ۲ و ۳ گرم بر لیتر) و همچنین سه سطح آنتی اکسیدان آسکوربیک‌اسید (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در سه زمان (۰، ۲ و ۴ ساعت) جهت غوطه وری و التیام ریزنمونه‌ها بعد از پایان مرحله استریل کردن[1] 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. به منظور استقرار ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه موراشیک و اسکوگ (MS) تغییریافته به همراه سه درصدساکاروز و ۶/۲ گرم برلیتر آگارز استفاده گردید. همانطور که گفته شد، به منظور کنترل فنل و بهبود استقرار ریزنمونه‌های پایه پسته UCB1، از غلظت‌های مختلف زغال فعال در محیط کشت استفاده گردید. صفات مورد مطالعه در این آزمایش شامل درصد زنده‌مانی جوانه (عدم ترشح فنل)، درصد نمونه‌های باززایی شده (استقرار) و درصد سوختگی انتهایی (زردی) جوانه بازشده بود.

تکنیک التیام بعد از استریل کردن (CAS)

در انتها به منظور رفع آسیب‌های صورت گرفته در مرحله آماده‌سازی و رفع مشکل فنل، ریزنمونه‌ها به مدت (۰، ۲و ۴ ساعت) درون غلظت‌های مختلف محلول آسکوربیک‌اسید (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر) غوطه‌ور گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌ها حاکی از آن بود که تاثیرغلظت‌های مختلف زغال‌فعال، غلظت و زمان‌های مختلف غوطه‌وری در بر صفات مورد مطالعه (میزان ریزنمونه‌های فنلی نشده و باززایی کرده) در سطح آماری یک درصد معنی‌دار گردید. تفاوت آماری معنی-داری بین غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۲ و ۳ گرم برلیتر) زغال فعال مورد استفاده در محیط کشت، غلظت آسکوربیک اسید و مدت

[1] Curing after sterilization (CAS)

زمان غوطه‌وری وجود داشت. مطالعه برهمکنش اثرات سه‌گانه غلظت زغال فعال، غلظت محلول آنتی‌اکسیدان و مدت زمان غوطه‌وری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف به‌کار رفته وجود داشت به طوریکه بیشترین میزان زنده‌مانی (۶۶ درصد) وعدم ترشح ترکیبات فنلی (۸۰ درصد) مربوط به تیمار ۱گرم برلیتر زغال‌فعال+ غوطه‌وری درون‌محلول ۱۵۰میلی‌گرم‌برلیتر آنتی‌اکسیدان به مدت دوساعت بود این درحالی است که بیشترین میزان سوختگی (۱۰۰ درصد) حاصل از ترشح و اکسیداسیون ترکیبات فنلی مربوط به تیمار شاهد (فاقد زغال فعال و بدون غوطه‌وری) بود و هیچ‌کدام از ریزنمونه‌ها استقرار نیافتند و در اثر ترشح ترکیبات فنلی و اکسیداسیون حاصل از آن ازبین رفتند. تولید و ترشح ترکیبات فنلی و اکسیداسیون آنها منجر به قهوه‌ای شدن بافت و محیط کشت می‌گردد که با ادامه این روند منجر به سیاه شدن و مرگ سلولی می‌گردد. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، 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. غوطه وری قبل از استریلیزاسیون با هدف ترمیم و التیام آسیب حاصل از برش و تهیه ریزنمونه صورت می‌گیرد و غوطه‌وری بعد از استریلیزاسیون به منظور به حداقل رساندن تاثیر منفی حاصل از مواد ضدعفونی‌کننده صورت می‌گیرد. نتایج آزمایشات حاکی از آن بود که غوطه‌وری ریزنمونه‌ها درون محلول‌های آنتی‌اکسیدانی تاثیر بسزایی در کنترل فنل و قهوه‌ای شدن داشت. غوطه‌وری ریزنمونه‌ها بعد از استریل کردن به مدت ۲ ساعت درون محلول ۱۵۰میلی‌گرم آسکوربسک‌اسید بدون در نظرگرفتن اثر سایرتیمارها منجر به کنترل ۵۳درصدی فنل گردیدکه این موضوع با نتایج آزمایش‌های مطابقت داشت که اظهار داشتند غوطه‌وری ریزنمونه درون آب مقطر دوبارتقطیر به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه منجر به موفقیت ۵۵ و ۷۰ درصدی در کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردید (Mohammadi et al. 2011).

تصویر۱- تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان استقرار ریزنمونه‌های پایه ویشی یوسی‌بی-۱

الف: محیط کشت شاهد (فاقد زغال فعال) و بدون غوطه‌وری بعداز استریلیزاسیون. ب: تاثیر غوطه‌وری بعد از استریلیزاسیون برباززایی

نتایاج آزمایشات نشان داد که غوطه‌وری درون غلظت‌ها (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر) و زمان‌های مختلف (۰، ۲ و ۴ساعت) به تنهایی نتوانست منجر به کنترل کامل فنل و استقرار صد درصدی گردد لذا به منظور بهبود کنترل فنل و استقرار ریزنمونه‌های پایه یوسی‌بی۱ از غلظت‌های مختلف زغال فعال نیز استفاده شد. محیط حاوی زغال فعال دارای پتانسیل بالایی در کنترل فنل دارد (Yam et al., 1990)، افزودن زغال‌فعال به محیط‌کشت پایه، به طورقابل توجهی قهوه‌ای شدن محیط را در کشت درون‌شیشه‌ای پسته کاهش داد (Safari et al., 2013) که این موضوع با نتایج حاصل از آزمایش ما نیز مطابقت داشت. با افزایش غلظت زغال تاثیر منفی برکنترل ترکیبات فنلی داشت که احتمالا به خاطر افزایش اسمز محیط وایجاد تنش یا یافت ریزنمونه و در ادامه منجر به ترشح فنل می‌شد. زغال فعال به عنوان جاذب ترکیبات فنلی در کشت درون شیشه‌ای در چندین گونه از گیاهان خانواده آناکاردیاسه گزارش گردیده است.

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. Baker, F. S., Miller, C. E., Repik, A. J., Tolles, E. D., Kroschwitz, J. I., & Howe Grant, M. (1992). Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.

3. Bon, M.C., M. Gendraud and A. Franclet, 1988. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of Sequoiadendron giganteum: Influence of activated charcoal. Scientia Horticulturae, 34: 283-291.546.

4. Budavari S. Merck Index Whitehouse Station. NJ Merck; 1996.

5. Carlberg, I., Glimelius, K., & Eriksson, T. (1983). Improved culture ability of potato protoplasts by use of activated charcoal. Plant cell reports, 2(5), 223-225.

6. FRIDBORG, G., PEDERSÉN, M., LANDSTRÖM, L. E., & ERIKSSON, T. (1978). The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiologia Plantarum, 43(2), 104-106.

7. Horner, M., McComb, J. A., MoCOMB, A. J., & Street, H. E. (1977). Ethylene production and plantlet formation by Nicotiana anthers cultured in the presence and absence of charcoal. Journal of Experimental Botany, 28(6), 1365-1372.

8. Jafarkhani, K.M., Z.S. Hosseini and A.A. Habashi (2009) A refined tissue culture medium for in vitro proliferation of apple rootstocks.Acta. Hort. 829: 313-318.

9. 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.

10. 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.

11. Nezami S.R., A. Yadollahi, H. Hokmabadi, 2015a, Effects of Treatment of stock plant in dark condition on in vitroEstablishment of UCB1 (Hybrid of Pistacia integrima× P. atlantica) Rootstock, First International and 9th National Biotechnology Congress. Tehran, Iran.

12. 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.

13. Pan MJ, and Staden J (1998) The use of charcoal inin vitroculture—a review. Plant Growth Regul. 26:155–163.

14. Safari, Z., Mehrabi, A. A., and Arminian, A. (2013), In vitro Proliferation and Ex Vitro Rooting of Wild Pistachio (Pistacia atlantica spp mutica, accession: Kabirkuh). International Journal of Agriculture & Environment. Vol., 5 (2), 280-284.

15. Sharma, R. R., & Singh, S. K. (2002). Etiolation reduces phenolic content and polyphenol oxidase activity at the pre-culture stage and in-vitro exudation of phenols from mango explants. Tropical agriculture, 79(2), 94-99.

16. Theander, O., & Nelson, D. A. (1988). Aqueous, high-temperature transformation of carbohydrates relative to utilization of biomass. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 46, 273-326.

17. Weatherhead, M. A., Burdon, J., & Henshaw, G. G. (1978). Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 89(2), 141-147.

18. Yam, T. W., Ernst, R., Arditti, J., Nair, H., & Weatherhead, M. A. (1990). Charcoal in orchid seed germination and tissue culture media: a review.Lindleyana, 5(4), 256-265.

19. Zamir, R., N. Ali, S.T. Shah, T. Muhammad and S.A. Shah, 2007. in vitro Re-generation of guava (Psidiuna guajava L.) from shoot tips of mature trees. Pak. J. Bot., 39(7): 2395-2398.

The effect of immersion after sterilization in antioxidant and activated charcoal in control of phenolic compounds in vitro culture of explants pistachio rootstock UCB-1

S. R. Nezami[1], A. Yadollahi[2]*, H. Hokmabadi[4], S. sarikhani-khorami[3] and 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- Ph.D. Candidate , Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 4- Scientific Member of Semnan (Shahrood) Agricultural Research Center, Iran.

*Corresponding author: yadollah@modares.ac.ir

Abstract

Using bred fruit tree rootstocks can have a huge effect on increasing production and profitability. Using UCB-1 rootstock leads to increased productivity. So propagation of this rootstock in Iran, can have a huge effect on the economy. Exudation of phenolic compounds in in vitro proliferation of this rootstock is one of the limitation factors; therefore to the control of phenol, an experiment with 48 treatments was designed. The explants were immersed in different concentrations of ascorbic acid in various immersion times. As well,in order to improve the establishment protocol different concentrations of activated charcoal were used in MS medium. Finally, the results showed that treatment with 1 gL^{-1} activated charcoal and immersion of explants in ascorbic acid solution of150 mg/l for 2 hours was the most effective treatment in controling phenol exudation so that 80% of explants showed no phenol exudation and finally, 66% of explants were established.

Key words: control phenol, active charcoal, immersion after sterilization, ascorbic acid, citric acid, UCB-1 rootstock, MS