مقایسه کارایی زغال فعال و نانولوله کربن در رشد درون شیشه‌ای انگور

محمد زارعی*[۱]، مهدی علیزاده[۲]، مصطفی خوشحال سرمست[۲]، سارا خراسانی نژاد[۲]
[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد میوه‌کاری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
[۲] عضو هیات علمی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
*نویسنده مسئول: mohammadzarei0007@gmail.com

چکیده

فنل‌ها از مهم‌ترین ترکیبات ثانویه هستند که در پاسخ به شرایط محیطی در گیاهان تولید می‌شوند. قهوه‌ای شدن از مشکلات جدی در استقرار ریزنمونه‌ها در گیاهان چندساله چوبی است که انجام موفقیت آمیز تکنیک¬های درون شیشه‌ای را پیچیده می‌سازد. بنابراین لزوم حذف ترکیبات فنلی ریزنمونه و جلوگیری از فنوله‌شدن محیط کشت بافت گیاهی و ریزنمونه را آشکار می‌سازد. مطالعه حاضر به منظور بررسی یک رویکرد پیشگیرانه برای حل مشکل قهوه‌ای شدن ریزنمونه گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای با مهار و جذب ترکیبات فنلی از محیط کشت و بهینه سازی تاثیر غلظت های مختلف زغال فعال و نانولوله کربن بر رشد گیاه انجام شد. در مطالعه حاضر، اعمال تیمارها به ترتیب، شاهد، زغال فعال پودری و نانولوله‌های کربن در سه سطح (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) برای هر تیمار با سه تکرار به صورت طرح کاملا تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش بر روی گیاه انگور و تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم افزار spss در سطح پنج درصد انجام شد. چهل روز پس از واکشت و اعمال تیمارها بر روی نمونه‌های گیاهی صفات رویشی شامل تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، طول ریشه، کیفیت ظاهری، درصد ریشه زایی، طول ساقه مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به موارد بدست آمده از این پژوهش، بهترین نتایج کیفیت ظاهری و تعداد ریشه مربوط به تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانولوله کربن بود. در صورتی که کمترین میزان صفات، کیفیت ظاهری، تعداد ریشه، رشد طول شاخه و درصد ریشه‌زایی مربوط به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال مشاهده شد.

کلمات کلیدی: فنول، زغال فعال، نانولوله‌های کربن، کشت بافت، انگور

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera*) یکی از محصولات میوه عمده بر اساس هکتار کشت شده و ارزش اقتصادی جهان است (Elster, 2016) و جزء درختان خزان‌دار و یک محصول میوه مناطق معتدله و منشا باستانی دارد (Gray, 1995). ایران به عنوان یکی از مراکز پیدایش و پراکنش انگور در جهان از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است. (دولتی بانه و همکاران،، ۱۳۹۲). فناوری کشت بافت گیاهی بیشتر برای تکثیر گیاهان در سطح وسیع استفاده می‌شود (مشاری نصیرکندی و همکاران،، ۲۰۱۸). که از مشکلات کشت بافت گیاهی می توان به قهوه‌ای شدن ریزنمونه که حاصل پاسخ دفاعی گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنده اشاره کرد (Jones and Saxena, 2013). قهوه‌ای شدن یک مشکل جدی در استقرار ریزنمونه-ها در گیاهان چندساله چوبی و گیاهان تک لپه‌ای است که انجام موفقیت آمیز تکنیک‌های درون شیشه‌ای را پیچیده می‌سازد (Titov *et al.*, 2006). دلیل اصلی قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی تجمع و اکسایش ترکیبات فنلی در بافت‌ها می‌باشد که اغلب به عنوان پاسخ دفاعی گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنده رخ می‌دهد (Jones and Saxena, 2013).

نانولوله‌های کربنی یکی ازمهم‌ترین ساختارها در مقیاس نانو هستند.این مواد اولین بار در سال ۱۹۹۱ در درون دوده‌های حاصل از تخلیه الکتریکی کربن در یک محیط حاوی گاز نئون کشف شد این ترکیبات شیمیایی ، با ساختار اتمی شبیه صفحات گرافیت، از استوانه‌هایی با قطر چند نانومتر و طولی تا صدها میکرومتر تشکیل شده اند (قادری دهکردی، ۱۳۹۵). از جمله خصوصیات شاخص نانولوله‌های کربنی نسبت مساحت سطحی بالای آنها را می‌توان نام برد که خاصیت جذب بسیار خوبی برای ترکیبات مختلف آلی و یون‌های معدنی از خود نشان می‌دهند (نقی زاده و همکاران،

IrHC2019

۲۰۱۴). نانولوله‌های کربنی را می‌توان به‌عنوان یک جاذب موثر برای حذف آرسنیک از محلول‌های آبی با حجم بالا مورد استفاده قرار داد (نقی زاده و همکاران، ۲۰۱۴). زغال فعال دارای یک شبکه بسیار خوب از منافذ با سطح داخلی بالا است که بسیاری از مواد را می‌تواند جذب کند. زغال فعال اغلب در کشت بافت برای بهبود رشد استفاده می‌شود. این یک ماده متخلخل و بی‌مزه است و از طریق حذف تمام ناخالصی‌های غیرکربن و اکسیداسیون سطح کربن، از کربن ابتدایی متمایز می‌شود. جنبه‌های مختلف اثرات زغال فعال بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای، کشت بافت، جنین‌زایی سوماتیکی، تولید بذر مصنوعی، کشت پروتوپلاست، کشت بساک و میکروسپور، ریشه‌زایی شاخه‌های میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفته است (Thomas., 2008).

مواد و روش‌ها

به منظور بهینه‌سازی اثر زغال فعال بر میزان رشد و خصوصیات ظاهری کشت نمونه‌های درون شیشه‌ای انگور، پژوهش حاضر در آزمایشگاه کشت بافت، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. ریزنمونه‌های انگور از باغات استان گلستان تهیه شد. پس از تهیه مواد گیاهی و حذف برگ‌ها از مجاور تک‌گره، نمونه‌ها سه نوبت به مدت ۱۵ دقیقه با آب جاری و مایع ظرفشویی شستشو و سپس در قارچکش کاربندازیم (۲ گرم در لیتر) به مدت سه ساعت قرار و ظروف کشت و ابزار کشت با روش اتوکلاوکردن (استفاده از بخار با دمای بالای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در فشار ۱۵ pai^0) به مدت ۲۰ دقیقه سترون‌سازی شد. در این تحقیق در تمامی مراحل استقرار، پرآوری و واکشت، از محیط کشت MS حاوی IBA (2 mg/l) برای پرآوری استفاده شد. پس از انتقال ریزنمونه به داخل هود و انجام تیمارهای ضد عفونی به ترتیب الکل به مدت ۳۰ ثانیه و کلرید جیوه (۰/۱ درصد) به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. نگهداری نمونه‌های کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. غلظت زغال فعال و نانولوله کربن شامل شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، میلی‌گرم بر لیتر قبل از اتوکلاو کردن و هر تیمار در سه تکرار انجام گرفت. صفات رویشی مورد بررسی در اثر وجود زغال فعال و نانولوله‌های کربن شامل تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، طول ریشه، کیفیت ظاهری، درصد ریشه‌زایی، طول ساقه، تعداد روز تا اندازه گیری صفات، مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی ظاهری رشد نمونه‌ها به روش مشاهده‌ای انجام شد و نمونه‌ها از ۱ تا ۵ امتیازدهی شدند، که ۵ نشان دهنده بهترین وضعیت رشد و ۱ به معنی رشد نامطلوب است. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم افزار spss انجام شد.

نتایج و بحث

در پژوهش حاضر حاصل تجزیه واریانس نتایج (جدول ۱) اختلاف معنی‌داری بین صفات تعداد ریشه، کیفیت ظاهری، طول شاخه، درصد ریشه‌زایی مشاهده شد، به طوری که بیشترین تعداد ریشه مربوط به تیمار ۲۰۰ mg/l نانولوله کربن مشاهده شد. این در حالی است که بین تیمار شاهد و ۲۰۰ mg/l زغال فعال، اختلاف معنی داری از لحاظ آماری مشاهده نشد. همچنین کمترین تعداد ریشه در تیمار ۲۰۰ mg/l زغال فعال مشاهده شد. مشکل استفاده زغال فعال در محیط کشت این است که علاوه بر جذب مواد ناخواسته، ممکن است هورمون‌های مورد نیاز، ویتامین‌ها و ... را جذب کند (Thomas., 2008). Olah (۲۰۱۷) گزارش نمود که اضافه کردن ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال به محیط کشت تکثیر، در مورد شاخهٔ زایی (*V. berlandieri* × *V. riparia*) سودمند نبود، زیرا برخی از ریزنمونه‌ها از رشد مناسبی بهره‌مند نشدند، اگر چه برای یک دوره طولانی کاهش غلظت زغال فعال به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش شاخه‌زایی شده است. در آین آزمایش به نظر می‌رسد که با توجه به خاصیت زغال فعال در جذب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از محیط کشت تاثیر منفی بر ریشه‌زایی داشته باشد، بدین صورت که با افزایش زغال فعال، درصد ریشه‌زایی نمونه‌ها کاهش یافته است. تیمار ۵۰ mg/l زغال فعال اختلاف معنی‌داری را با شاهد و ۲۰۰ mg/l نانولوله کربن نشان نداد که می‌توان نتیجه گرفت که غلظت بالای زغال فعال موجب کاهش ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود. غلظت بالای زغال

IrHC2019

فعال در تیمار ۲۰۰ mg/l باعث کاهش کیفیت ظاهری در نمونه‌های مورد مطالعه شده است، در صورتی که اختلاف معنی‌داری در بین دیگر تیمارها از لحاظ کیفیت ظاهری مشاهده نشد. همچنین بیشترین طول شاخه در تیمار شاهد مشاهده شد با این حال اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد و تیمار ۱۰۰ mg/l نانولوله کربن مشاهده نشد. کمترین طول شاخه در تیمار ۲۰۰ mg/l بدست آمد که با تیمار ۲۰۰ mg/l نانولوله کربن اختلاف معنی‌داری نداشت، که می‌توان نتیجه گرفت غلظت بالای زغال فعال و همچنین، غلظت بالای نانولوله کربن موجب کاهش طول شاخه می‌شود. در این تحقیق بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار ۲۰۰ mg/l نانولوله کربن و پس از آن کمترین درصد ریشه‌زایی در تیمار ۲۰۰ mg/l زغال فعال مشاهده شد. به نظر می‌رسد که افزایش غلظت زغال فعال بر میزان ریشه‌زایی و طول شاخه اثر بازدارنده دارد.

زیرا تیمار ۲۰۰ mg/l زغال فعال باعث کاهش کیفیت ظاهری و تعداد ریشه شده است این در حالی است که بهترین تیمار برای کیفیت ظاهری و تعداد ریشه غلظت ۲۰۰ mg/l نانو لوله کربنی باشد.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف زغال فعال و نانولوله‌های کربن بر صفات رویشی انگور

منابع تغییرات	تعداد شاخه	تعداد برگ	تعداد ریشه	طول ریشه (cm)	کیفیت ظاهری	طول شاخه (cm)	ریشه زایی (٪)
شاهد	۳/۶۷	۱۳/۰۰	۱۷/۳۳^{a}	۲/۸۷	۴/۶۷^{a}	۸/۳۳^{a}	۱۰۰^{a}
۵۰ AC	۲/۳۳	۱۴/۶۷	۱۳/۰۰^{ab}	۸/۰۷	۴/۶۷^{a}	۶/۹۷^{abc}	۱۰۰^{a}
۱۰۰AC	۱/۰۰	۷/۶۷	۸/۰۰^{bc}	۳/۸۷	۴/۶۷^{a}	۶/۸۳^{abc}	۱۰۰^{a}
۲۰۰ AC	۴/۵۰	۲۰/۰۰	۳/۵۰^{c}	۶/۳۰	۳/۵۰^{b}	۳/۴۵^{d}	۵۰^{c}
۵۰ NA	۲/۳۳	۷/۶۷	۸/۶۷^{bc}	۲/۵۳	۴/۶۷^{a}	۵/۵۳^{bcd}	۱۰۰^{a}
۱۰۰ NA	۲/۰۰	۷/۶۷	۱۳/۶۷^{ab}	۴/۱۳	۵/۰۰^{a}	۷/۰۳^{ab}	۱۰۰^{a}
۲۰۰ NA	۲/۰۰	۱۱/۰۰	۱۸/۰۰^{a}	۳/۶۵	۵/۰۰^{a}	۴/۶۰^{cd}	۸۳^{b}
LSD	ns	ns	۵/۸۱۲**	ns	۰/۹۴۹**	۲/۵۸۲**	۱/۹۹۷**
p-value	۰/۱۵۷	۰/۱۷۷	۰	۰/۲۰۹	۰/۰۲۷	۰/۰۰۶	۰

AC: بیان کننده غلظت زغال فعال. NA: بیان کننده غلظت نانولوله کربن

منابع

دولتی بانه، ح.، ناظمیه، ع.، محمدی، س. ا.، حسنی، ق. و هناره، م. ۱۳۸۹. شناسایی و ارزیابی ارقام انگور محلی استان آذربایجان غربی با استفاده از روش‌های آمپلوگرافی و آمپلومتری. دوفصلنامه فنآوری تولیدات گیاهی، ۲(۱): ۱۳-۲۴.

قادری دهکردی، م. ۱۳۹۵. بررسی ساختار و روش های سنتز نانو لوله های کربنی. دومین کنفرانس بین المللی یافته های نوین پژوهشی در شیمی و مهندسی شیمی،۱-۱۳.

مشاری نصیرکندی، ع.، حسینی، ب.، فرخ زاد، ع. ر. و ناصری، ل. ع. ۲۰۱۸. بهینه سازی شرایط کشت بافت جهت ریزازدیادی پایه نیمه پاکوتاه سیب .M7 مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۵(۲): ۱۱۹-۱۳۷.

نقی زاده، ع.، درخشانی، ا. و جاوید، ا. ب. ۲۰۱۴. مقایسه کارایی نانو لوله های کربنی تک دیواره و چند دیواره در حذف آرسنیک از محلول های آبی. مجله سلامت و بهداشت، ۵(۱): ۳۶-۴۴.

Elster, J. 2016. Sour grapes. Cambridge university press.

Gray, D. J. 1995. Somatic embryogenesis in grape. In Somatic embryogenesis in woody plants. pringer, Dordrecht. 191-217

Jones, A. M. P. and Saxena, P. K. 2013. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. PloS one, 8(10): e76802.

IrHC2019

Olah, R. 2017. The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. Vitis, 56(4): 161-171.
Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology advances, 26(6): 618-631.
Titov, S., Bhowmik, S. K., Mandal, A., Alam, M. S., and Uddin, S. N. 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from Musa spp. cv. Kanthali floral bud explants. Am. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2(3): 97-104.

In vitro growth of Grapevine plantlets as affected by activated charcoal and carbon nanotubes

Mohammad Zarei[1]*, Mahdi Alizadeh[2], Mostafa K. Sarmast[2], Sara Khorasaninezhad[2]
[1*] MSc student of Pomology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan
[2] Academic members, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan
[*]*Corresponding Author: mohammadzarei0007@gmail.com*

Abstract

Phenols are one of the most important secondary compounds that are produced in response to environmental conditions in plants. Tissue browning is a serious problem in the establishment of explants in perennial woody plants, which complicates the success of the *in vitro* techniques. Therefore, it is necessary to remove the phenolic compounds of the explants and to prevent the phenol exudation of the plant tissue and explants in culture medium. The present study was carried out to investigate a preventive approach to solving the problem of browning of explants under *in vitro* conditions by inhibiting and absorbing phenolic compounds from the medium and optimizing the effect of different concentrations of active carbon and carbon nanotubes on grapevine plantlets growth. In the present study, treatments including control, powdered activated charcoal and carbon nanotubes at three levels (50, 100, 200 mg/l) were supplemented to already standardized proliferation medium. The experiment was undertaken as completely randomized design with three replications. The statistical analysis of data was done by SPSS software at 5% level. Forty days after inoculation and applying treatments growth parameters *i.e.* number of branches, number of leaves, number of roots, root length, apparent quality, rooting percentage and stem length were investigated. According to the results, the best apparent quality and a greater number of roots were recorded in medium supplemented with 200 mg/l carbon nanotube. Addition of 200 mg/l powdered active charcoal led to inferior apparent quality, low number of roots, shorter branch length and rooting percentage as compared to control.

***Keywords*:** Phenol, activated charcoal, Carbon nanotube, Tissue culture, Grapevine

IrHC2019