واکنش درون شیشه ای گیاه پالونیا به منابع مختلف زغال فعال در محیط کشت

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 می‌باشند که در پاسخ به شرایط محیطی در گیاهان تولید می‌شوند. قهوه‌ای شدن آنزیمی معمولا در اثر ایجاد زخم بر روی ریزنمونه و ترشح مواد فنلی و قرار گیری این مواد در مجاورت آنزیم‌های اکسید کننده فنل صورت می‌گیرد که این فرایند باعث کاهش موفقیت در کشت بافت گیاهی می‌شود. جهت رفع این مشکل مطالعه مواد جذب کننده فنل از محیط کشت و بهینه سازی غلظت‌های مختلف آن‌ها می‌تواند موثر باشد. در پژوهش حاضر از زغال فعال که دارای یک شبکه بسیار خوب از منافذ با سطح داخلی بالا و نانولوله‌های کربنی از ورق های گرافنی که به‌صورت لوله‌های استوانه‌ای به دور هم پیچیده شده‌اند جهت برطرف کردن این مشکل استفاده گردید. در مطالعه حاضر، اعمال تیمارها به ترتیب شامل شاهد، زغال فعال پودری و نانولوله‌های کربن در چهار سطح (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) برای هر تیمار با سه تکرار به صورت طرح کاملا تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش با گیاه پالونیا و تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم افزار spss در سطح (۵٪) انجام شد. چهل روز پس از واکشت و اعمال تیمارها بر روی نمونه‌های گیاهی صفات رویشی شامل تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، طول بزرگترین ریشه‌چه، طول کوچکترین ریشه‌چه، کیفیت ظاهری، درصد ریشه زایی، طول بزرگترین شاخه، طول کوچکترین شاخه، مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش مشخص شد که غلظت‌های بالای زغال فعال باعث کاهش ریشه‌زایی در نمونه های گیاه پالونیا شده به‌طوری که بیشترین تعداد ریشه در غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال بدست آمد.

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

مقدمه

تمام سلول‌های زنده گیاهی توانایی باززایی و تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند که به این خاصیت توتی پوتنسی می‌گویند. که این خاصیت از طریق کشت پروتوپلاست‌ها، سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها در محیط آزمایشگاهی مورد بهره برداری قرار گرفته است (Pan, 1998). آغاز یک کشت موفقیت آمیز در شرایط درون شیشه‌ای لازمه برای تکثیر ریزازدیادی است، از آنجایی که شکست در این مرحله، یک متخصص کشت‌بافت را با مشکل مواجه می‌کند(Krishna *et al*., 2008). زغال فعال دارای یک شبکه بسیار خوب از منافذ با سطح داخلی بالا است که بسیاری از مواد را می توان جذب کند (Thomas, 2008). زغال فعال به عنوان یک ترکیب تصفیه کننده و رنگ آمیزی برای مایعات از قرن هجدهم استفاده شده است (Pan *et al*., 1998). اثر حفاظتی زغال می تواند در کشت پروتوپلاست، و طی انجماد در انتقال ژن کمک کند (Olah, 2017). قهوه‌ای شدن آنزیمی توسط برهم کنش آنزیم‌هایی مانند پلی فنل اکسیداز (PPO) و بسترهای فنلی، باعث آسیب ساختاری به بافت گیاه می‌شود و در نهایت منجر به تولید رنگدانه‌های تیره تر (قهوه‌ای) می‌گردد (آبدانان مهدی‌زاده و نعمتی‌نیا، ۱۳۹۵). نانولوله‌های کربنی ورق‌های گرافنی هستند که بصورت لوله‌های استوانه‌ای به دور هم پیچیده شده‌اند (Ntim and Mitra, 2012). خواص منحصر به فرد مواد نانو ساختار (اندازه کوچک، واکنش پذیری بیوشیمیایی بالا، توانایی نفوذ به سلول‌ها و توزیع سریع در داخل ارگانیسم‌ها) آنها را به عنوان ابزار جالب برای تکنیک های مدیریت محصول می دانند (Khodakovskaya *et al*., 2012) استفاده از زغال فعال در محیط کشت سبب افزایش

IrHC2019

جوانه‌زنی *Lavandula latifolia* شد. از سوی دیگر علیرغم افزایش رشد گیاهچه‌های *Anemone coronaria* تاثیر منفی بر شکل گیری ریشه‌ها داشته است ولی از قهوه‌ای شدن محیط کشت جلوگیری نموده است (Mensuali-Sodi *et al*., 1993). با توجه به مطالعات صورت گرفته، این پژوهش به اثر منابع مختلف کربن (زغال فعال و نانو لوله‌های کربن) بر میزان جذب فنول و رشد گیاهچه‌های پالونیا در محیط کشت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بهترین روش استفاده از این مواد و میزان مناسب بکار گیری منابع مختلف کربن (زغال فعال، نانولوله های کربن) ارزیابی شد.

مطالعه حاضر به منظور بررسی مقایسه و بهینه سازی کارایی استفاده از زغال فعال و نانو کربن برای حل این مشکل، در نتیجه کاهش اثر ترکیبات فنلی بر ریزنمونه و رشد ریزنمونه انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بهینه‌سازی اثر زغال فعال بر میزان رشد و خصوصیات ظاهری کشت نمونه‌های درون شیشه‌ای پالونیا، پژوهش حاضر در آزمایشگاه کشت بافت، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. گیاهچه های پالونیا با استفاده از کشت بذر در محیط درون شیشه مستقر شدند. شاخه های درون شیشه ای چندین نوبت روی محیط پایه MS حاوی IBA (4 mg/l) بازکشت شدند تا تعداد زیادی کشت درون شیشه پالونیا به دست آمد. در این پژوهش، همین محیط کشت با غلظت های مختلف زغال فعال و نانولوله کربن شامل شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شد و ریزنمونه‌های دوبندی پالونیا در این محیط کشت ها قرار گرفت. تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، طول ریشه، کیفیت ظاهری، درصد ریشه‌زایی، طول ساقه چهل روز پس از کشت 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 (سطح ۵٪).

نتایج و بحث

طبق نتایج حاصل شده از پژوهش حاضر، کمترین تعداد ریشه در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ گرم بر لیتر زغال فعال مشاهده شد. و بیشترین میزان تولید ریشه در شاهد و غلظت‌های ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال مشاهده شده، طول کوچکترین شاخه، در غلظت‌های ۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن به بالاترین میزان رسید. پس مقدار نانو کربن تا غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر مثبتی بر روی طول کوچکترین ساقه داشته است، اما نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های زغال فعال اثر مثبتی بر طول شاخه پالونیا نداشته است، به‌طوری که اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. اما به‌طور کلی مقدار ریشه با توجه به بالا رفتن غلظت زغال فعال کاهش یافته است. بیشترین درصد ریشه‌زایی در شاهد و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال مشاهده شد و می‌توان گفت که بهترین غلظت برای ریشه زایی غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن بود. 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). در صورت جذب هورمون تاثیر بر کاهش صفات رشدی گیاه می‌شود. همانطور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود. غلظت‌های بالای زغال فعال باعث کاهش ریشه‌زایی شده به‌طوری که در غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال بیشترین میزان تعداد ریشه را بدست آمد.

IrHC2019

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

منابع تغییرات	تعداد شاخه	تعداد برگ	تعداد ریشه	طول بزرگترین ریشه (cm)	طول کوچکترین ریشه (cm)	کیفیت ظاهری	طول بزرگترین شاخه (cm)	طول کوچکترین شاخه (cm)	ریشه زایی (٪)
شاهد	۱/۰۰۰	۹/۵۰۰	۱۷/۵۰۰^{a}	۴/۶۵۰	۰/۴۵۰	۳/۵۰۰	۳/۹۰۰	۰/۰۰۰^{c}	۱۰۰/۰۰۰^{a}
۵۰ AC	۱/۶۷۰	۱۷/۳۳۳	۲۱/۳۳۳^{a}	۵/۲۰۰	۰/۵۰۰	۴/۶۷۰	۴/۴۶۷	۲/۰۶۷^{a}	۱۰۰/۰۰۰^{a}
۱۰۰ AC	۱/۳۳۰	۵/۶۶۷	۱۴/۰۰۰^{ab}	۵/۶۰۰	۱/۲۰۰	۳/۳۳۰	۳/۷۳۳	۰/۵۶۷^{bc}	۸۳/۰۰۰^{b}
۲۰۰ AC	۲/۶۷۰	۱۹/۰۰۰	۲۰/۳۳۳^{a}	۳/۹۳۳	۰/۴۶۷	۳/۶۷۰	۳/۹۶۷	۱/۶۶۳^{a}	۶۶/۰۰۰^{c}
۴۰۰ AC	۱/۶۷۰	۱۱/۶۶۷	۱۲/۳۳۳^{ab}	۴/۴۴۳	۰/۲۳۳	۴/۰۰۰	۳/۳۰۰	۱/۹۶۷^{a}	۱۰۰/۰۰۰^{a}
۵۰ NA	۲/۳۳۰	۱۷/۳۳۳	۲۳/۳۳۳^{a}	۳/۸۶۷	۰/۸۰۰	۴/۶۷۰	۴/۴۶۷	۰/۶۶۷^{b}	۶۷/۰۰۰^{c}
۱۰۰ NA	۲/۶۷۰	۱۹/۶۶۷	۱۰/۶۶۷^{ab}	۴/۲۳۳	۰/۵۶۷	۴/۶۷۰	۵/۳۰۰	۰/۴۳۳^{bc}	۱۰۰/۰۰۰^{a}
۲۰۰ NA	۱/۶۷۰	۱۹/۳۳۳	۳/۳۳۳^{b}	4.700	۰/۹۰۰	۴/۶۷۰	۴/۸۰۰	۰/۶۰۰^{bc}	۶۶/۰۰۰^{c}
۴۰۰ NA	۳/۵۰۰	۱۳/۰۰۰	۵/۰۰۰^{b}	۶/۱۰۰	۱/۴۰۰	۵/۰۰۰	۴/۷۵۰	۰/۲۰۰^{bc}	۶۷/۰۰۰^{c}
p-value	۰/۳۷۵	۰/۱۱۶	۰/۰۲	۰/۹۸۴	۰/۱۸۲	۰/۳۹۸	۰/۴۹۹	۰	۰
LSD	ns	ns	۱۲/۹۸۷	ns	ns	ns	ns	۰/۶۱۳	۱/۸۸۲

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

منابع

آبدانان مهدی‌زاده، س. و نعمتی‌نیا، ا. ۱۳۹۵. سنجش میزان قهوه ای شدن آنزیمی با استفاده از فوریه بافت فرکتال تصویر در نمونه‌های سیب و موز برش خورده. فصلنامه فناوری های نوین غذایی. ۱۴: ۴۳-۵۴.

Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS nano, 6(3): 2128-2135.

Krishna, H., Sairam, R. K., Singh, S. K., Patel, V. B., Sharma, R. R., Grover, M., Nain, L. and Sachdev, A. 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia horticulturae, 118(2): 132-138.

Mensuali-Sodi, A., Panizza, M., Serra, G. and Tognoni, F. 1993. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue cultures. Scientia horticulturae, 1: 49-57.

Ntim, S. A. and Mitra, S. 2012. Adsorption of arsenic on multiwall carbon nanotube–zirconia nanohybrid for potential drinking water purification. Journal of colloid and interface science, 375(1): 154-159.

Olah, R. 2017. The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. Vitis, 56(4): 161-171.

Pan, M. J. and Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in in vitro culture–A review. Plant growth regulation, 3: 155-163.

Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology advances, 26(6): 618-631.

IrHC2019

In vitro response of Paulownia explants to different charcoal sources

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. In the present study the effect of different concentrations of active carbon and carbon nanotubes on Paulownia plantlets growth was investigated. The treatments including control, powdered activated charcoal and carbon nanotubes at three levels (50, 100, 200 and 400 mg/l) were supplemented to already standardized paulownia 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, it was found that the rooting was negatively affected by charcoal concentration and the highest number of roots was recorded in media supplemented with 50 mg/l charcoal.

Keywords: Phenol, activated charcoal, Carbon nanotube, Tissue culture, Paulownia

IrHC2019