کاهش قهوه ای شدن ریز نمونه های سه رقم نظنز، سبری و شکری گلابی در کشت درون شیشه ای

صفیه وطن دوست جرتوده (۱)، غلامحسین داوری نژاد (۲)، علی تهرانی فر (۲)، حامد کاوه (۱)
۱-دانشجوی دکتری علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد

ارقام نطنز، سبری و شکری گلابی از بهترین ارقامی هستند که در ایران در سطح وسیعی کشت و کار شده و بازارپسندی خوبی دارند ولی تکثیر آنها مشکل است. کشت درون شیشه ای یکی از روش هایی است که برای کاهش این مشکل مفید است. به هر حال مانند بسیاری از گیاهان چوبی، درصد بسیار بالایی از ریزنمونه ها در اولین مرحله از کشت بافت به دلیل ترشح مواد فنولی و قهوه ای شدن محیط کشت از بین می روند. هدف این آزمایش، بررسی اثر رقم، محیط کشت، زمان نمونه گیری، نوع ریزنمونه و روش کنترل قهوه ای شدن بر شدت این عارضه در بافت ها و محیط کشت می باشد. جوانه های انتهایی و جانبی به عنوان ریزنمونه در بهار و تابستان پس از استریلیزاسیون در محیط کشت MS و WPM کشت شدند. بر اساس نتایج این آزمایش، رقم سبری بیشترین شدت قهوه ای شدن را داشت. همچنین مشخص شد که شدت قهوه ای شدن در ریزنمونه هایی که در تابستان کشت شده بودند، در ماکسیمم مقدار خود و حدود ۹۵ درصد بود. قهوه ای شدن در محیط کشت MS از WPM بالاتر بود. نوع ریز نمونه نیز قهوه ای شدن را تحت تاثیر قرار داد و جوانه های انتهایی نسبت و جوانه های جانبی دوم و سوم فنول بیشتری ترشح کردند. سرانجام، انتخاب جوانه های جانبی به جای جوانه انتهایی به عنوان ربز نمونه در فصل بهار و نگهداری آنها در محیط سرد با دمای ٤ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ تا ۱۲ ساعت و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر اسید آسکوربیک قبل از ضد عفونی برای ۱۵ دقیقه در سه رقم گلابی برای کاهش قهوه ای شدن مفید بود. استفاده از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پلی وینیل کلراید در محیط کشت تاثیری در کنترل این عارضه نداشت.

کلمات کلیدی: MS، WPM، فنول، جوانه

مقدمه:

تیره شدن محیط کشت و از بین رفتن ریز نمونه ها که در بعضی از گونه ها از جمله گلابی وجود دارد،به علت آزاد شدن ترکیب های فنولی از بافت های آسیب دیده می باشد که پس از اکسیده شدن توسط آنزیم پلی فنول اکسیداز[۲۷] (PPO) موجب رنگی شدن ریز نمونه ها و محیط کشت می شوند. تعدادی از ریزنمونه ها مقداری مواد فنولیک در خود دارند و یا در اثر برش یک سری مواد متابولیک ثانویه در آنها تولید می گردد که بعدا اکسید شده ومنجر به قهوه ای شدن محیط کشت و مرگ ریز نمونه می گردد (آلییو، ۲۰۰۵) استفاده از آنتی اکسیدانت ها (مانند اسید آسکوربیک) و مواد جاذب (مانند زغال فعال شده) از متداول ترین روش هایی هستند که برای حل این مشکل استفاده می شوند، اما با پرورش گیاه مادری در شرایط مطلوب، بهتر می توان قهوه ای شدن ریز نمونه ها را برطرف نمود(میر و هارل،۱۹۷۹). نور و گرما از عوامل تحریک کننده ی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز هستند، بنابراین قرار دادن ریزنمونه ها در دمای پایین و تاریکی می تواند یکی از راه کارهای مناسب باشد (بلاک و لانکس، ١٩٩٦). موفقیت در کشت بافت در درختان میوه خصوصا گلابی، به طور وسیعی با میزان قهوه ای شدن بافت ها مرتبط است. ارقام آسیایی گلابی بیشتر از ارقام اروپایی در معرض قهوه ای شدن هستند، همچنین قهوه ای شدن در تابستان بیشتر رخ می دهد (کومار و ژانگ، ۲۰۰۸).

مواد و روش: بمنظور تهیه ریزنمونه، شاخه هایی بطول ۲۰ سانتی متراز قسمت های بیرونی تاج درختان ارقام مذکور در فصول مختلف سال (بهار و تابستان) انتخاب گردید. پس از انتقال به آزمایشگاه شست و شوی سطحی آن ها انجام و سپس ریزنمونه از آنها تهیه گردید. بمنظور ضدعفونی ریزنمونه ها ابتدا آنها را با مایع دستشویی اوه[۲۸]، شست و شوی سطحی داده و

[27] -Polyphenol oxidase
[28] -Ave

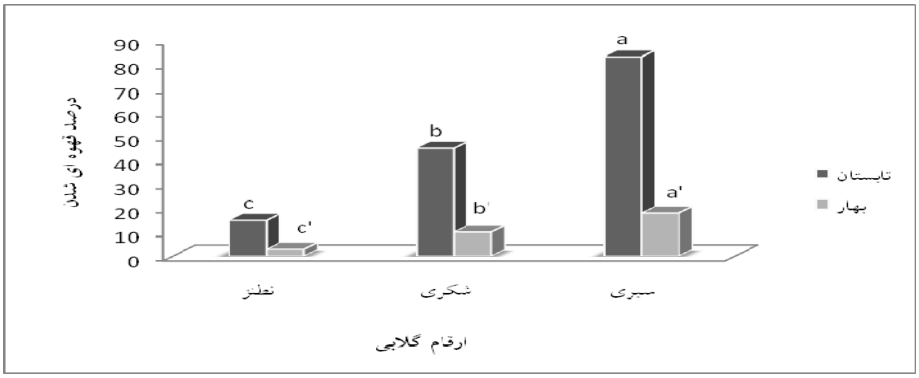
سپس بمدت ۳۰ دقیقه در زیر آب روان قرار گرفتند، پس از گذشت این زمان با الکل ۷۰ درصد به مدت۳۰ ثانیه تیمار شدند. پس از ضدعفونی سطحی نمونه ها ،برای کنترل آلودگی های قارچی از هیپوکلریت سدیم با غلظت های ۱.۵ درصد دارای ۰.۱ ٪ توین۲۰ بمدت ۱۵ دقیقه و برای کنترل آلودگی های باکتریایی از۲۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم درون محیط کشت استفاده شد. ریز نمونه ها بصورت فلس دار و بدون فلس آماده شدند.برای استقرار نمونه ها از محیط کشت های MS (موراشی و اسکوگ، ١٩٦٢) دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۸ گرم در لیتر آگار و WPM (لوید و مک کاون، ۱۹۸۰) دارای۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۸ گرم در لیتر آگار استفاده گردید. برای حذف مواد فنولی و کاهش قهوه ای شدن ریزنمونه ها تیمارهای مختلفی به شرح زیر انجام شد:

سرمادهی نمونه ها ۱۲ ساعت قبل از کشت در ٤ درجه سانتی گراد، استفاده از اسید آسکوربیک به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در مرحله ضدعفونی به مدت ۱۵ دقیقه ، استفاده از اسید آسکوربیک به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر درون محیط کشت ، استفاده از PVP به غلظت ۰.۰۲٪ درون محیط کشت ،سرمادهی نمونه ها ۱۲ ساعت قبل از کشت در ٤ درجه سانتی گراد و استفاده از اسید آسکوربیک به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در مرحله ضدعفونی، سرمادهی نمونه ها ۱۲ ساعت قبل از کشت در ٤ درجه سانتی گراد و استفاده از اسید آسکوربیک به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر درون محیط کشت، سرمادهی نمونه ها ۱۲ ساعت قبل از کشت در ٤ درجه سانتی گراد و استفاده از PVP به غلظت ۰.۰۲٪ درون محیط کشت، سرمادهی نمونه ها ۱۲ ساعت قبل از کشت در ٤ درجه سانتی گراد و استفاده از اسید آسکوربیک به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در مرحله ضدعفونی. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در۳ تکرار و در هر تکرار ٦ ویال انجام شد.

نتایج و بحث:

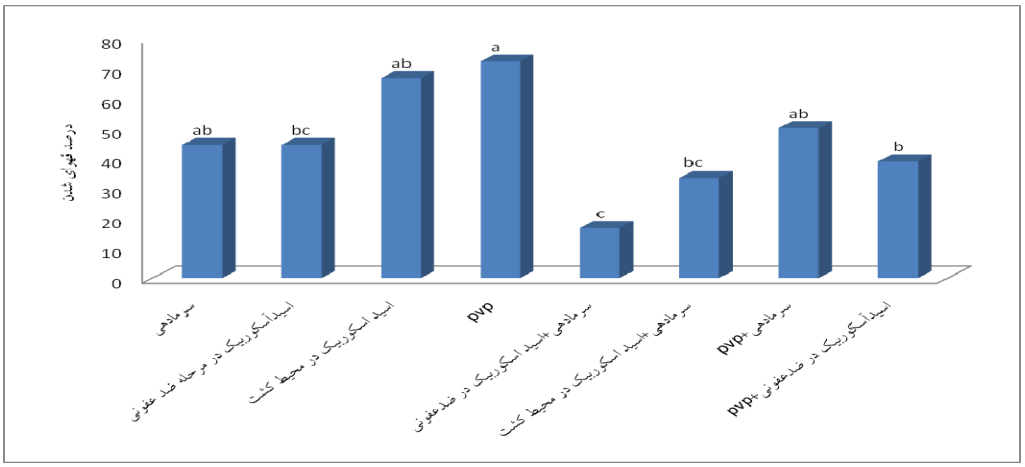
موثرترین غلظت هیپوکلریت سدیم در کنترل آلودگی قارچی، ۲٪ بود که البته با این غلظت تعداد زیادی از نمونه ها بشدت قهوه ای می شدند، بنابراین برای روش ضدعفونی از غلظت ۱/۵ ٪ هیپوکلریت سدیم استفاده شد. در آزمایش مشخص گردید که نوع رقم بطور معنی داری بر میزان قهوه ای شدن تاثیر گذار است بگونه ای که رقم سبری بیشترین درصد قهوه ای شدن را بروز داد و پس از آن شکری و سپس نطنز قرار داشت. همچنین مشخص شد که زمان نمونه گیری نیز بر میزان قهوه ای شدن موثر است، ریزنمونه های گرفته شده در تابستان بطور معنی داری از ریز نمونه های گرفته شده در بهار مواد فنولی بیشتری را در محیط کشت آزاد کردند. با توجه به این موضوع تیمار های قهوه ای شدن برروی رقم سبری مورد بررسی قرار گرفت و بهترین تیمار به عنوان یک روش کلی برای کنترل قهوه ای شدن برای هر سه رقم بکار رفت(نمودار ۱).

نمودار (۱)- درصد قهوه ای شدن در ریزنمونه های گرفته شده در بهار و تابستان در سه رقم سبری،شکری و نطنز



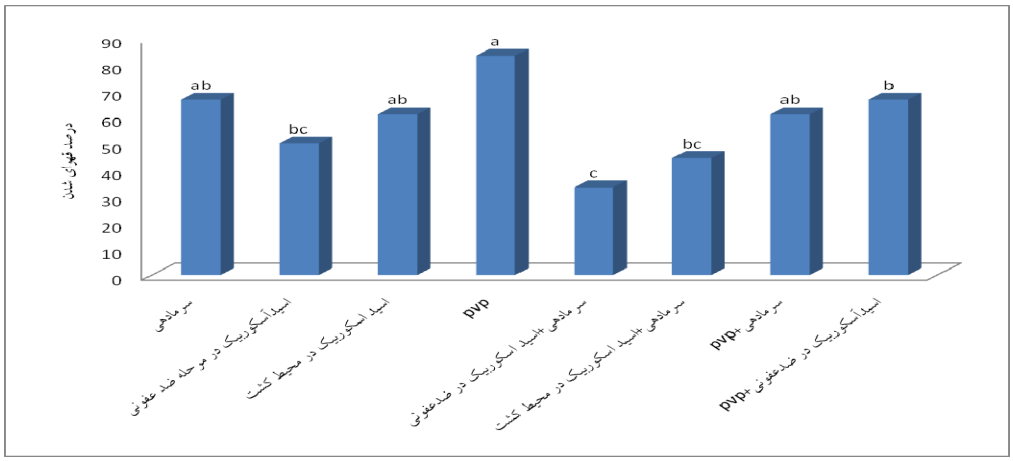
براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها مشخص گردید که حضور و یا عدم حضور فلس برروی جوانه بطور معنی داری در میزان قهوه ای شدن موثر است و جدا نمودن فلس ها باعث افزایش این موضوع می گردد.همچنین در بین تیمار های انجام شده مشخص شد که کاربرد PVP درون محیط کشت در جوانه های فلس دار کمترین اثر را در کنترل قهوه ای شدن نسبت به سایر تیمارها داشت ($P\leq$٪۵). بهترین تیمار در کاهش ترشح مواد فنولی سرمادهی نمونه ها ۱۲ ساعت قبل از کشت در ٤ درجه سانتی گراد همراه با کاربرد ۱۰۰ میلی گرم در لیتر اسید آسکوربیک در مرحله ضدعفونی به مدت ۱۵ دقیقه بود. همچنین سرمادهی نمونه ها قبل از کاشت همراه با کاربرد اسید آسکوربیک درون محیط کشت نیز تا حد زیادی قهوه ای شدن ریزنمونه ها را نسبت به شاهد کاهش داد در صورتی که کاربرد اسید آسکوربیک در محیط کشت به تنهایی تاثیر بسیار ناچیزی در کنترل این مشکل داشت(نمودار ۲).

نمودار (۲) – درصد قهوه ای شدن در تیمارهای مختلف در جوانه های فلس دار رقم سبری



در مورد جوانه های بدون فلس نیز سرمادهی نمونه ها قبل از کاشت همراه با کاربرد اسید آسکوربیک درون محیط کشت بطور معنی داری در کاهش قهوه ای شدن موثر بود که البته این مقدار از جوانه های فلس دار کمتر بود. کاربرد PVP درون محیط کشت کمترین اثر را در کنترل ترشح مواد فنولی داشت (نمودار ۳). براساس نتایج این آزمایش مشخص شد که هرچه ایجاد زخم برروی ریز نمونه بیشتر باشد ترشح مواد فنولی نیز بیشتر خواهد بود که با یافته های آلیبو در سال ۲۰۰۵ مطابقت دارد و قرار دادن ریز نمونه ها در دمای پایین و استفاده از آنتی اکسیدانت ها در کنترل قهوه ای شدن بسیار موثر است و کاربرد اسید آسکوربیک در مرحله ضدعفونی موثرتر از کاربرد آن در محیط کشت می باشد که با نظر کومار و همکارانش(۲۰۰۸) مشابهت دارد.

نمودار(۳)– درصد قهوه ای شدن در تیمارهای مختلف در جوانه های بدون فلس رقم سبری



منابع:

Aliyu ,O. M . 2005 . Application of tissue culture to cashew (Anacardium occidentale) breeding: an appraisal. African J Biotechnology, 4(13): 1485–1489.

Block, R. and Lankes, C. 1996 . Measures to prevent tissue browning of explants of apple rootstock M.9 in vitro establishment. Gartenbauwisssenschaft 61:11-17.

Kumar, B. and Zhang, Y. 2008 .Adventitious shoot regeneration from the leaves of some pear varieties (Pyrus spp.) grown in vitro.Front. Agric. China, 2(1): 82–92.

Mayer, A.M. and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-251.