کنترل آلودگی و ترکیبات فنلی در کشت بافت گل ارکیده (*phalaenopsis*)

فاطمه نیکزاد (۱)، قاسمعلی گروسی(۲)، علی وطن پور ازغندی (۳) رامین حسینی (۲)

۱و۲ - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و اعضای هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، ۳- عضو هیئت علمی مؤسسه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

گل های ارکیده از خانواده orchidaceae ازبازارپسندترین و ارزشمندترین گل ها بوده که به صورت شاخه بریده و گلدانی می باشند که ریز ازدیادی آن در شرایط درون شیشه با مشکل رفع آلودگی های اولیه و کنترل تولید ترکیبات فنلی در محیط کشت روبرو می باشند. به منظور مطالعه و حل این مشکلات برای سهولت ریز ازدیادی، به مدت ۱۰ دقیقه از گیاهان گلدانی ارکیده برای تهیه ریز نمونه ها استفاده گردید. ضدعفونی برگ، ساقه ابتدا با الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با هیپوکلریت ۱٪ حاوی دو قطره توین-۸۰ به مدت ۲۰ دقیقه (درریز نمونه های گلبرگ و دمگل ۱۵ دقیقه) انجام و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. ساقه های حامل جوانه طی دو مرحله ضد عفونی گردیدند: درمرحله اول ریزنمونه ها با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت۲/۵٪ حاوی ۲ قطره توین-۸۰ به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی کرده و سپس براکته ها ی بیرونی جوانه ها را در شرایط استریل بر داشته و مجددا در هیپوکلریت ۲/۵٪ با ۲ قطره توین ۸۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده و سپس ۳ مرتبه در آب مقطر استریل شستشو داده شد. برای کاهش ترکیبات فنلی در محیط کشت علاوه بر ضد عفونی، ریزنمونه ها را پس از۴۵ دقیقه در آب مقطر قرار دادن به مدت نیم ساعت در مخلوط اسید استیک رقیق شده و اسید آسکوربیک قرار داده و سپس ۲ مرتبه آن ها را با آب مقطر استریل می شوییم. همچنین در محیط کشت از تیمار اسید آسکوربیک و ذغال فعال نیز استفاده شد. نتایج نشان داد که ضمن کنترل کامل آلودگی های قارچی و باکتریایی، هر چند تولید ترکیبات فنلی کاملا حذف نمی شود ولی بسته به محیط و بسته به عواملی چون سن گیاه، نوع ریز نمونه، دما و نیز بسته به نوع و غلظت هورمون ها میزان متفاوتی ترکیبات فنلی ایجاد می کنند. ، هورمون های سیتوکینینی به نسبت هورمون های اکسینی البته در غلظت های برابر، میزان بیشتری فنل در محیط آزاد می کند که این مسئله به خصوص در غلظت های بالاتر از ۲ میلی گرم در لیتر در TDZ کاملا مشهود بود.

مقدمه

گیاهان خانواده فالنوپسیس یکی از بازار پسند ترین و با ارزش ترین گیاهان گلدانی در و شاخه بریده می باشد که ازدیاد آن در محیط درون شیشه (*in vitro*) ، به علت مشکلات زیادی که در تکثیر زایشی (تفرق صفات و عدم شباهت گیاهان تولید شده به گیاه مادری ، عدم باروری طبیعی گیاه ، هترومورف بودن جوانه زنی و زمان طولانی بلوغ بذر) این گیاه وجود دارد، می تواند به عنوان بهترین راه حل مطرح باشد. لذا کشت بافت این گیاه از مدت ها پیش مسئله ای قابل توجه بوده است، ولی نکاتی مانند کنترل آلودگی اولیه قارچی و باکتریایی و کاهش ترکیبات فنلی در محیط کشت از مشکلات آن می باشد. از آن جا که این امر در سلامت و بقای نمونه ها و حصول نتیجه بسیار اهمیت دارد در این مطالعه سعی شد راه کارهایی برای غلبه بر مشکلات ارائه گردد.

مواد و روش ها

در این مطالعه گیاهان گلدانی ارکیده (*phalaenopsis*) مورد استفاده قرار گرفت.

الف: مواد گیاهی و ضدعفونی: برگ و ساقه های مورد استفاده معمولی با الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و با هیپوکلریت ۱٪ همراه با دو قطره توییین-۸۰ به مدت ۲۰ دقیقه (در ریز نمونه های گلبرگ و دمگل این زمان ۱۵ دقیقه) ضدعفونی و در نهایت۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شد. در ضدعفونی ریزنمونه ساقه های گره دارحامل جوانه ضد عفونی در دو مرحله انجام شد: درمرحله اول ریزنمونه ها با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت۲/۵٪ حاوی ۲ قطره توییین-۸۰ به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی کرده و پس از برداشتن براکته های روی جوانه در شرایط استریل، ریز نمونه ها را مجددا در هیپوکلریت ۲/۵٪ با ۲ قطره توییین-۸۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرارداده و سپس ۳ مرتبه در آب مقطر استریل شستشو گردید.

ب) کنترل و کاهش انتشار فنل در محیط: به منظور کنترل و کاهش تولید ترکیبات فنلی به روش زیر اعمال گردید:

۱) قبل از ضد عفونی نمونه ها به مدت ۲ ساعت در زیر آب روان قرار داده شد.
۲) پس از ضدعفونی و شستشوی ریزنمونه ها با الکل و هیپوکلریت به روش فوق الذکر آنها را به مدت ٤٥ دقیقه در آب مقطر و به مدت نیم ساعت در محلول اسید استیک رقیق شده (۱۰۰ cc در لیتر) و اسید آسکوربیک ۱۰۰ میلی گرم در لیتر قرار داده و در نهایت ۲ مرتبه آن ها را با آب مقطراستریل شسته شد.
۳) نمونه های استریل شده را در محیط های کشت مورد نظر که حاوی ۸۰ میلی گرم اسید آسکوربیک می باشد کشت گردیده به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی و سرما (دمای ٥-٦ درجه) قرار داده شد.
٤) نمونه های کشت شده در محیط اولیه را پس از فعال شدن و رسیدن به مرحله مطلوب به محیط های بعدی که دارای ۲ گرم زغال فعال در لیتر هستند منتقل می کنیم.

نتایج و بحث

نتایج رفع آلودگی ها قارچی و باکتریایی نشان داد که روش مورد استفاده در کنترل آلودگی روشی مؤثری بوده به نحوی که آلودگی ها کاملا حذف و تحت کنترل در آمد، ضمن اینکه سلامتی ریز نمونه ها برای ادامه کار حفظ گردید. لذا روش مورد استفاده روش اطمینان بخش و با ریسک خطر بسیار پایینی تشخیص داده شد.

در خصوص کنترل تولید ترکیبات فنل نمونه های شاهد(فاقد تیمار حذف ترکیبات فنل ولی با شرایط هورمونی و محیط غذایی ثابت) به دلیل شدت وجود ترکیبات فنل نمونه ها هر ٤-۳ روز و یا ۲ هفته یک بار بازکشت می شدند. نتایج نشان داد که در این نمونه ها رشد و جنین زایی جانبی (حتی تا مرحله تشکیل ساقه و برگ) و حتی مسیرهای کالوس زایی نیز فعال گردیده، اما وجود این ترکیبات مانعی برای رشد مناسب آن ها بوده و تعداد جنین های جدید و بقای آن ضعیف تر و ساقه و برگ های تشکیل شده از نظر اندازه، تعداد و وضعیت عمومی رشد کمتر و ضعیف تر از نمونه ها تیمار شده بودند و حتی گاهی در دراز مدت از بین می رفتند (جداول آماری نشان داده نشده است). گرچه در این گونه نمونه ها با بازکشت ٤-۳ روز نمونه ها سالم بودند و حتی به مراحل تولید کالوس، برگ و ساقه می رسند اما همراه با صرف وقت و هزینه بالایی می باشند. در تیمارهای شاهد که ۲ هفته یکبار بازکشت شدند بیش از ٦۰٪ نمونه ها از بین رفتند.

در مقابل نتایج حاصل از اعمال تیمار کنترل ترکیبات فنل حاکی از آن بود که علیرغم انجام بازکشت در دوره های ۳-۲ هفته ای میزان تولید و انتشار این ترکیبات در محیط کشت به میزان بسیار قابل ملاحظه ای کاهش می یابد.

تیمار نمک های غذایی و هورمون های رشد متفاوت نیز بی تأثیر در تولید این ترکیبات نبودند. در محیط های مورد آزمایش فاقد هورمون شدت تولید فنل به ترتیب در ORCHIMACS > PHYT > MS > 1/2 MS > B5 > NDM مشاهده

گردید. علی رغم این که در محیط های اول و دوم از سمت چپ بیشترین شدت تولید فنل دیده می شد، اما وضعیت عمومی نمونه ها در آن ها بسیار بهتر از سایرین بود(نتایج آماری ارایه نشده است). در نتیجه قطعا نوع و میزان نمک های موجود در محیط ها نیز در میزان تولید فنل موثرند.

در نمونه های کشت شده در محیط های حاوی هورمون های رشد در غلظت های بیشتر از۱mg/L برای NAA, IAA و BA و بیشتر از۲ mg/L برای TDZ تولید ترکیبات فنلی از ۱۵ روز به بعد آغاز شد، تا حدی که محیط را تیره می کرد اما با اعمال تیمار های کنترل فنل این وضعیت تا ۱ هفته به تعویق افتاده و میزان تولید این ترکیبات به کمتر از میزان تولید فنل در نمونه های شاهد بود. استفاده از زغال فعال در این محیط ها تاثیری شگرف در کاهش ترکیبات فنلی گزارد.

تقدیر و تشکر

با تقدیر و تشکر فراوان از آقای مهندس مخبری مدیریت محترم شرکت گل پرور که در تهیه این گیاه ما را یاری فرمودند و همچنین خانم مهندس قنادنیا جهت کمک ها و راهنمایی های آزمایشگاهی.

منابع مورد استفاده

1-Denis T.T. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. Elsevier Inc.

2- Moraes L.M, Faria .R.T, Cuquel F.L. Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. ISHI

3- Wang P.J. and Hung L.C. (1976). Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue culture and organ culture. *In vitro*. No 12 volt 3.

4-Chen J.T, Chang W.C. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explant of *phalaenopsis ambilis*. *Biological planttarum* 50, 169-173.

5-Kou H.L. Chen J.T., and Chang W.C. (2005). Efficient plant regeneration through somatic embryo genesis from leaf explant of phalaenopsis. *Dev. Boil.-Plant*, 41:453-456.

6-Chen T. Y., Chen J.T. and Chang W.C. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf culture of *paphiopedium* orchids

7-Tanaka M, Kumura M, and Goi M. Surface-stralization for in vitro culture of phalaenopsis flower-stalk cutting using antimicrobial (http://www.actahort.org).

Control of contamination and phenolic compounds in orchids (phalaenopsis) tissue culture media

Nikzad F.[1], Garoosi G.A.[1], Hosseini R.[1] and Vatanpour azgandi A.[2]

1&2 Agriculture biotechnology Dept., Imam Khomeini Interenational Univ
. and Iran Agriculture Biotechnology institution

Abstract:

Orchid plants from *phalaenopsis* are the valuable and marketable cut- flowers. In seed origin proliferation normally occurs segregation traits at advance generation, specially in open crossing plants, such as most flowers that is not favorite for them which is needed to be propagated through asexual propagation. However, there are more different method for asexual propagation in which the in vitro culture provides a commercial reliable mass production which in some cases involved with some problems such as fungus and bacterial contamination and also diffusion of phenolic compounds in culture media specially in orchids tissue culture.

In order to overcome to mentioned problems in orchids young plants were subjected to provide explants. Leaf and stem explants were sterilized with 30% ethanol for 30 sec and 1% sodium hypochlorite contains two drop of tween-80 for 20 mins (in petal and peduncle for15 mins) and rinsed for 3 times with sterile distilled water. Stems contain internodes and side meristem sterilized in two time and steps separately as described in text. Treatments which were used for reducing phenolic compounds carried out in some steps including imbedding in running water, sterilization, using acetic acid, ascorbic acids and active coil in sterilization step and in media as described in text.

Results indicated complete elimination of fungus and bacterial contamination. Phenolic compounds diffusion in media was reduced significantly in compare with controls. In addition it seems that salt and hormones composition affect on this problem which more detail was discussed.

Key words: Orchids, contamination, phenolic compounds, micropropagation, phalaenopsis