فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد هیجدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ppt.2018.6196.1357

اثر عوامل مختلف کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

The Effect of Various Factors on Browning of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Explant *In Vitro*

حمید امیری[۱]، موسی موسوی[۲*] و عزیز تراهی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۰۱

چکیده

یکی از مشکلات تکثیر خرما در کشت بافت، قهوه‌ای شدن ریزنمونه است. این پژوهش جهت تعیین اثر عوامل مختلف کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونهٔ نخل خرما در شرایط درون شیشه‌ای در قالب ۵ آزمایش اجرا گردید. در آزمایش اول ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ در دو حالت مختلف: یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای بررسی گردید. در آزمایش دوم از تیمار پوترسین در غلظت‌های صفر (۰)، ۴ و ۸ میلی‌مولار استفاده شد. در آزمایش سوم تأثیر محیط کشت پایه MS کامل، ۱/۲MS و ۱/۴MS، در آزمایش چهارم تأثیر سولفات روی و نانوذرات اکسید روی شامل MS بدون روی، MS به‌علاوه ۲/۴۳ و ۴/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر روی و MS به‌علاوه ۲/۴۳، ۴/۸۶ و ۹/۷۲ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی موردبررسی قرار گرفتند و در آزمایش پنجم تأثیر سیستم‌های کشت (ظرف فیلتردار، ظرف بدون فیلتر و بیورآکتور تناوبی) ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که ضدعفونی کردن در یک مرحله با هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ همراه با تکان شدید مؤثرتر از ضدعفونی در دو مرحله بود. نتایج حاصل از آزمایش دوم نشان داد که غلظت ۴ میلی‌مولار پوترسین در کاهش میزان قهوه‌ای شدن نسبت به شاهد و غلظت ۸ میلی‌مولار اثر بیشتری داشت. همچنین محیط پایه MS کامل و تیمار ۴/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر روی، نتایج بهتری به‌ترتیب در آزمایشات سوم و چهارم نشان دادند. نتایج آخرین آزمایش نشان داد که کشت در ظروف شیشه‌ای با درپوش فیلتردار نسبت به ظروف کاملاً بسته و بیورآکتور تناوبی کم‌ترین میزان قهوه‌ای شدن را به همراه داشت.

واژه‌های کلیدی: هیپوکلریت سدیم، سولفات روی، پوترسین، نانوذرات اکسید روی، بیورآکتور تناوبی

۱ و ۲. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳. عضو هیئت علمی پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری، اهواز، ایران
*: نویسنده مسئول Email: mousa_mousawi@yahoo.com

مقدمه

بافت‌های نخل خرما که به‌عنوان ریزنمونه در شرایط کشت بافت به‌کار می‌روند از خود موادی ترشح می‌کنند که این مواد علاوه‌بر این‌که باعث قهوه‌ای شدن تدریجی بافت و محیط‌کشت می‌گردند، خاصیت سمی برای بافت دارند. به‌طوری‌که باعث ممانعت از رشد گردیده، در نهایت منجر به از بین رفتن بافت ریز نمونه می‌گردند (*شاهین*[1]، 1990).

قهوه‌ای شدن بافت معمولاً در اثر ترشح مواد فنولیک به محیط از محل برش و در اثر زخمی شدن سلول‌های این محل و سپس اکسید شدن آن‌ها به‌وسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز صورت می‌گیرد که در مرحله اول موادی بنام *کوئینون*[2] تشکیل می‌شوند که برای بافت سمی می‌باشند. سپس این مواد به لکه‌هایی به رنگ قهوه‌ای تیره یا سیاه تبدیل می‌شوند (*مارشال*[3] و همکاران، 2000). تراوش ترکیبات فنولیک عمدتاً در کشت بافت گیاهان چوبی نظیر درختان میوه همچون موز (*گالیزی*[4] و همکاران، 1981)، گردو (امام، ۱۳۸۳) و کاکائو (*آلمینو*[5] و همکاران، 2003) و هم‌چنین درختان جنگلی همچون کاج (*تانگ*[6] و همکاران، 2004) و اکالیپتوس (عصاره و زندی، ۱۳۸۶) باعث بروز مشکل قهوه‌ای شدن می‌گردند. قهوه‌ای شدن در شرایط درون شیشه‌ای وابسته به رقم بوده و شدت آن در ارقام مختلف متفاوت است. عمده‌ترین ترکیباتی که باعث قهوه‌ای شدن بافت‌های نخل خرما در شرایط کنترل شده می‌شوند عبارت‌اند از *کافیویل شیکیمیک اسید*[7]، *فلاوان*[8]، و *مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید*[9] می‌باشند. در پینه نخل خرما در طی مرحله جنین‌زایی ممکن است برخی از مواد فنلی تجمع پیدا کنند که پس از یک ماه از کشت پینه، رنگ آن شروع به قهوه‌ای شدن می‌کند این تغییر در رنگ ناشی از اکسید شدن کافیویل شیکیمیک اسیدها و تجمع فنل‌های با *جایگزینی متوکسی*[10] همچون *مشتقات سیناپیک*[11] است. ۳-۲ ماه پس از کشت، دو ترکیب فنولی دیگر بنام‌های DHC3 و DHC4 نیز تجمع پیدا می‌کنند. هر دوی آن‌ها از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید بوده شامل *پی-کوماریک*[12]، *فرولیک*[13] و *سیناپیک اسید*[14] می‌باشند (*ال حدرمی و البلاج*[15]، 2004). هم‌چنین *زوین* و *ال حدرمی*[16] (2004) گزارش دادند که وجود ساکارز به غلظت ۳ درصد در محیط‌کشت نسبت به غلظت‌های ۱/۵ و ۶ درصد باعث تجمع مواد فنلی بیشتری در بافت جنین‌زای نخل خرما گردید.

جهت برطرف نمودن مشکل قهوه‌ای شدن بافت‌های خرما در کشت بافت، مواد مختلفی توسط محققین زیادی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند ازجمله آن‌ها می‌توان به استفاده از محلول آنتی‌اکسیدان شامل ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدسیتریک و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید اسکوربیک (*تیسرات و زاید*[17]، 1983)، سیترات آمونیوم، آدنین و گلوتامین (*شاهین*، 1990)، *دی هیدروکسی نفتالین*[18] و *دی متیل سولفوکساید*[19] (*تیسرات*، 1979a)، *پلی ونیل پیرولیدون*[20] (*بیوچسن*[21]، 1983) و زغال فعال (*تیسرات*، 1979b؛ *زاید*، 1984) اشاره کرد. در حال حاضر از زغال فعال به‌دلیل سمی نبودن استفاده بیشتری می‌گردد. استفاده از ریزنمونه‌های تهیه شده از مواد گیاهی گرفته شده در فصل‌های زمستان و بهار و افزودن زغال فعال به محیط‌کشت می‌تواند این پدیده را کاهش دهد (*آل خطیب*، 2008). هم‌چنین کاربرد اسید آسکوربیک پیش از ضدعفونی سطحی ریزنمونه ها و کشت روی محیط MS دارای ۳ گرم بر لیتر زغال فعال، بهترین روش برای جلوگیری از این پدیده بیان شده است (*طه*[22] و همکاران، 2007). استفاده از قطعات ریزنمونه کوچک و واکشت نمودن آن‌ها در فواصل زمانی کوتاه‌تر نیز در رفع این مشکل می‌تواند مؤثر باشد (*زاید*، 1986). در سال ۲۰۰۴ *تانگ* و همکاران نیز از پلی آمین‌های *پوترسین*[23] و *اسپرمیدین*[24] جهت برطرف نمودن مشکل قهوه‌ای شدن پینه‌های *کاج ورجینیا*[25] در شرایط کنترل شده استفاده کردند.

هدف از این پژوهش که در قالب پنج آزمایش مجزا اجرا گردید کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما

1. Shaheen
2. Quinones
3. Marshall
4. Galeazzi
5. Alemanno
6. Tung
7. Caffeoylshikimic Acids
8. Flavans
9. Hydroxycinamic Acid Derivatives
10. Methoxy Substituted Phenols
11. Sinapic Derivatives
12. P-coumaric
13. Ferulic
14. Sinapic Acid
15. El Bellaj and El Hadrami
16. Zouine and El Hadrami
17. Zaid and Tisserat
18. Dihydroxynaphtalene
19. Dimethylsulfoxide
20. PVP
21. Beauchesene
22. Taha
23. Putrescine
24. Spermidine
25. *Pinus virginiana* Mill.

(شامل قطعات مریستم انتهایی و برگ‌های اولیه) در شرایط کشت بافت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

مواد اولیه گیاهی مورداستفاده جهت تهیه ریزنمونه شامل پاجوش‌های ۴-۳ ساله ارقام استعمران (از اهواز) و کبکاب (از شهرستان بهبهان) می‌باشند. برای باز کردن پاجوش‌ها از یک چاقوی بزرگ به طول بیش از نیم‌متر استفاده گردید. برگ‌ها یکی پس از دیگری از سمت بیرونی‌ترین برگ‌های چسبیده به پاجوش به‌آرامی و پس از کشیدن به‌طرف خارج به‌وسیله چاقو حذف شده درنهایت نمونه باقی‌مانده که دارای ابعاد ۸×۳ سانتی‌متر و دربرگیرنده نوک شاخه و برگ‌های اولیه است آماده ضدعفونی سطحی شد.

آزمایش‌های ضدعفونی سطحی و کنترل قهوه‌ای شدن

آزمایش اول (ضدعفونی ریزنمونه‌ها)

برای غلبه بر آلودگی قارچی و باکتریایی و سالم ماندن ریزنمونه‌ها، قبل از تقسیم آن‌ها به قطعات کوچک‌تر و انتقال به محیط‌کشت تحریک پینه، باید به‌وسیله روش مناسبی ضدعفونی سطحی شوند. برای این منظور آزمایشی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با دو روش ضدعفونی کردن در سه تکرار و با استفاده از رقم کبکاب انجام گردید:

الف: ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم در دو مرحله و بدون تکان دادن (تیسرات، 1991) که شامل مراحل زیر است:

- شستشو با آب لوله شهری و صابون مایع.
- قرار دادن در محلول آنتی‌اکسیدان سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) شامل ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سیتریک به‌مدت تقریباً یک ساعت
- قرار دادن در وایتکس تجاری ۵۰٪ (دارای ۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم) محتوی چند قطره توین[1] ۲۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه بدون هیچ‌گونه تکان‌دهی
- سه بار شستشو با آب مقطر استریل
- حذف برگ‌های اضافی و بیرون آوردن مریستم و چند برگ اولیه اطراف آن به ابعاد یک سانتی‌مترمربع
- قرار دادن در وایتکس ۵٪ محتوی چند قطره توین ۲۰ به‌مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه
- سه بار شستشو با آب مقطر استریل

ب: ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم در یک مرحله و با تکان دادن شدید که شامل مراحل زیر است:

- شستشو با آب استریل
- قرار دادن در محلول آنتی‌اکسیدان سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) شامل ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سیتریک به‌مدت تقریباً یک ساعت
- قرار دادن در وایتکس تجاری ۵۰٪ (دارای ۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم) محتوی چند قطره توین-۲۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه با تکان‌دهی شدید در جهت عمودی و افقی توسط دست
- سه بار شستشو با آب مقطر استریل

پس از ضدعفونی بافت مریستمی، آن را به ریزنمونه‌های کوچک‌تر (۳-۲ میلی‌متر) تقسیم کرده، ۳ ریزنمونه در هر پتری‌دیش و مجموعاً در ۱۰ پلیت کشت شدند.

آزمایش دوم (تیمار پوترسین)

در این آزمایش اثر پوترسین به‌عنوان عامل کاهش‌دهنده قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه نخل خرما در شرایط درون شیشه‌ای موردبررسی قرار گرفت. برای این منظور پوترسین در سه غلظت صفر (۰)، ۴ و ۸ میلی‌مولار و بر روی دو رقم استعمران و کبکاب آزمایش گردید. محیط مورداستفاده شامل محیط پایه MS (*موراشیگ* و *اسکوگ*[2]، 1962) که علاوه‌بر نمک‌های استاندارد تشکیل‌دهنده آن محتوی ۱۷۰ میلی‌گرم بر لیتر NaH_2PO_4، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود. از آگار نیز به میزان ۷/۵ گرم بر لیتر جهت نیمه‌جامد شدن محیط استفاده گردید. کلیه کشت‌ها در دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داشته شدند. نمونه‌های کشت شده پس از ۵ هفته موردبررسی قرار گرفتند.

آزمایش سوم (مقایسه غلظت‌های ترکیبات کشت محیط MS)

در این آزمایش اثر غلظت ترکیبات ماکرو محیط‌کشت MS در سه سطح، بر میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌های نخل خرما رقم استعمران در قالب طرح کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار موردبررسی قرار گرفت. محیط‌های MS استفاده شده در این آزمایش شامل: MS کامل، ½MS، ¼MS به‌عنوان محیط پایه که هرکدام محتوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات، ۳ گرم بر لیتر زغال فعال، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۱ میلی‌گرم بر لیتر بیوتین و ۷/۵ گرم بر لیتر آگار بود. در محیط ½MS و ¼MS فقط

1. Tween

2. Murashige and Skoog

غلظت ترکیبات ماکرو (پرمصرف) به ½ و ¼ غلظت MS کامل کاهش داده شد.

آزمایش چهارم (تأثیر نانوذرات اکسید روی)

این آزمایش به‌منظور مشاهده تأثیر عنصر روی به‌صورت سولفات روی و نانوذرات اکسید روی بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های بافت مریستمی نخل خرما رقم استعمران در شرایط درون شیشه‌ای طراحی گردید که بدین منظور، از غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی با خلوص ۹۹/۸٪ و به‌اندازه ذرات ۱۲-۶ نانومتر به شکل صورت پودر سفید متمایل به زرد (تهیه شده از شرکت نانوپارس اسپادانا) استفاده شد. در این آزمایش ابتدا استوک با غلظت بالا از نانو ذرات تهیه شد و سپس به میزان موردنیاز برای هر محیط از آن برداشته شد. برای تهیه استوک پس از محاسبه، میزان موردنیاز از نانوذرات اکسید روی را وزن و در ارلن ۵۰۰ سی‌سی در آب مقطر ریخته شد و سپس به‌مدت ۴۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (۱۰۰ وات، ۴۰ کیلوهرتز و در دمای ۳۵ درجه) قرار داده تا محلول یکنواخت استوک تهیه شده و تیمارهای لازم اعمال شد. تیمارهای به‌کار برده شده در این آزمایش شامل محیط MS بدون روی، محیط MS با غلظت‌های ۲/۴۳ و ۴/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر عنصر روی با منشاء سولفات روی و محیط MS حاوی غلظت‌های ۲/۴۳، ۴/۸۶ و ۹/۷۲ میلی‌گرم بر لیتر عنصر روی با منشاء نانوذرات اکسید روی بودند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار اجرا گردید.

آزمایش پنجم (مقایسه سیستم‌های مختلف کشت)

در این آزمایش اثر سه سیستم کشت بر روی کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل‌خرما رقم استعمران مورد ارزیابی قرار گرفتند. سیستم‌های به‌کار رفته شامل ظرف‌های شیشه‌ای با درپوش فیلتردار (۰/۲۲ میکرون)، ظرف‌های شیشه‌ای با درپوش بدون فیلتر (کاملاً کیپ) و بیورآکتور تناوبی با سیستم تهویه فشاری[1] بودند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با حداقل ۳ تکرار اجرا شد. محیط‌کشت مورداستفاده در این آزمایش شامل MS کامل به‌عنوان محیط پایه به همراه ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات، ۳ گرم بر لیتر زغال فعال، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بیوتین بود. برای ظرف‌های دارای فیلتر و بدون فیلتر محیط به‌صورت نیمه‌جامد است به‌عبارت‌دیگر در این محیط‌ها پس از تنظیم پی‌اچ بر روی ۵/۷، مقدار ۷/۵ گرم بر لیتر آگار به آن‌ها اضافه کرده سپس اتوکلاو شدند. محیط به‌کار رفته در بیورآکتور مایع و فاقد آگار بود.

سیستم بیورآکتور تناوبی

این بیورآکتور که در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه شهید چمران اهواز طراحی و ساخته شد از یک مخزن محیط‌کشت و دو محفظه‌ی کشت تشکیل شده است. درون هریک از محفظه‌ها از یک صفحهٔ جداکننده مشبک استفاده شد که به‌وسیله‌ی پایه‌های پلاستیکی درون محفظه‌های کشت مهارشده است. ریزنمونه‌ها بر روی این صفحه‌ها مستقر می‌شوند. در این سیستم از دو نوع پمپ هوا استفاده شد (پمپ هوا با فشار قوی برای تغذیه و پمپ هوا با فشار ضعیف برای تهویه سیستم). هم‌چنین در این بیورآکتور از یک تایمر جهت تنظیم دوره‌های تغذیه استفاده گردید به‌طوری‌که با تنظیم آن، هر ۶ ساعت یک‌بار، پمپ روشن شده و محیط غذایی را به درون محفظه‌های کشت تزریق می‌کرد. محل استقرار مخزن محیط، کمی پایین‌تر از محفظه‌های کشت قرار داشت و محیط مایع درون آن به‌طور مرتب توسط یک مگنت استییرر (جهت جلوگیری از ته‌نشین شدن) هم زده می‌شد. بنابراین در هر مرحله تزریق محیط به درون محفظه‌های کشت و خاموش شدن پمپ، محیط در اثر نیروی ثقل مجدداً به مخزن باز می‌گشت. لازم به ذکر است که در مسیر ورودی پمپ‌ها به محفظه‌های کشت و هم‌چنین محل خروج هوا از آن‌ها، فیلترهای ۰/۲۲ میکرون نصب‌شده بودند (شکل ۱).

روش سنجش میزان قهوه‌ای شدن

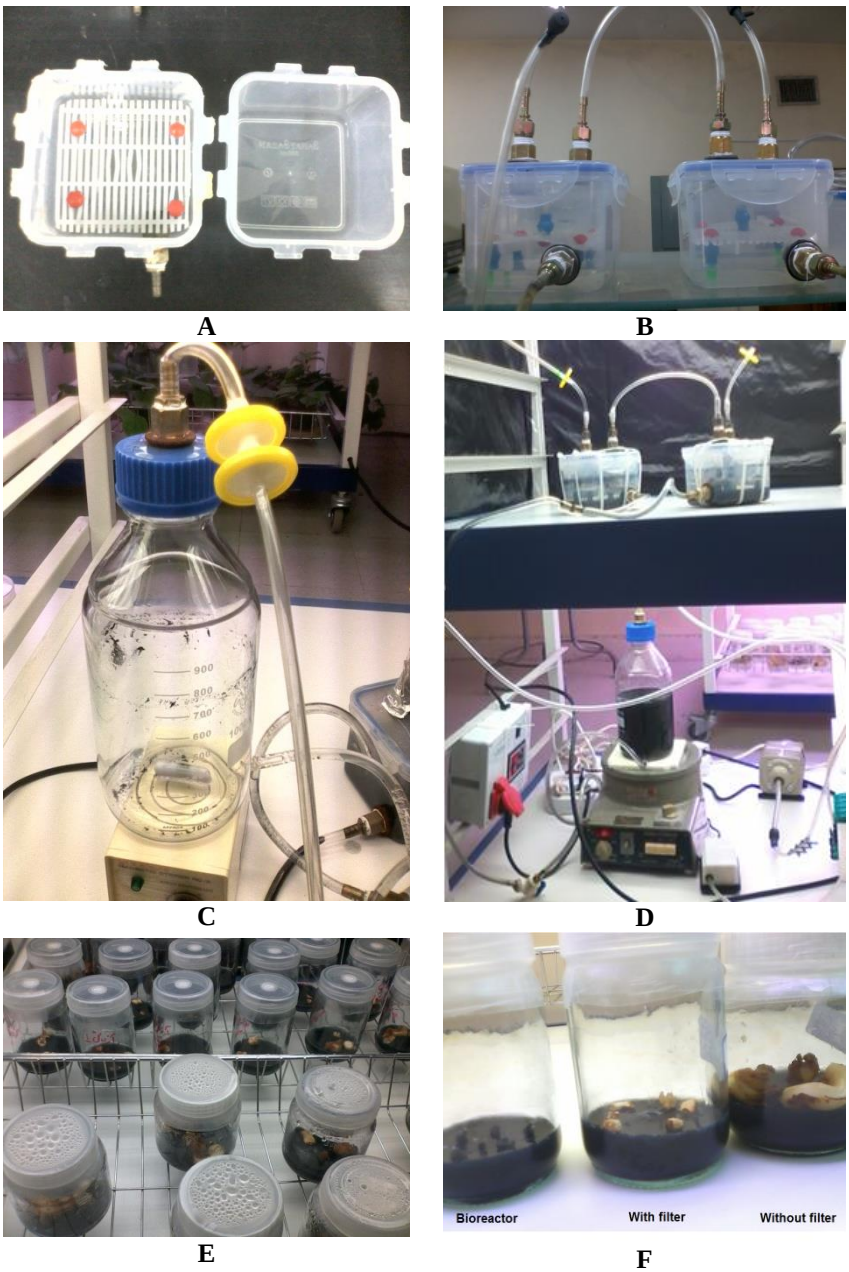
جهت سنجش میزان قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌های نخل خرما از روش *اولیویرا*[2] و همکاران (1994) استفاده گردید. این روش مبتنی بر سنجش میزان رنگ قهوه‌ای عصاره ریزنمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول ۴۴۰ موج نانومتر است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گردید و آنالیز واریانس برای هرکدام از تیمارها محاسبه شد. میانگین‌ها نیز در سطح احتمال ۵٪ به‌وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم مقایسه شدند.

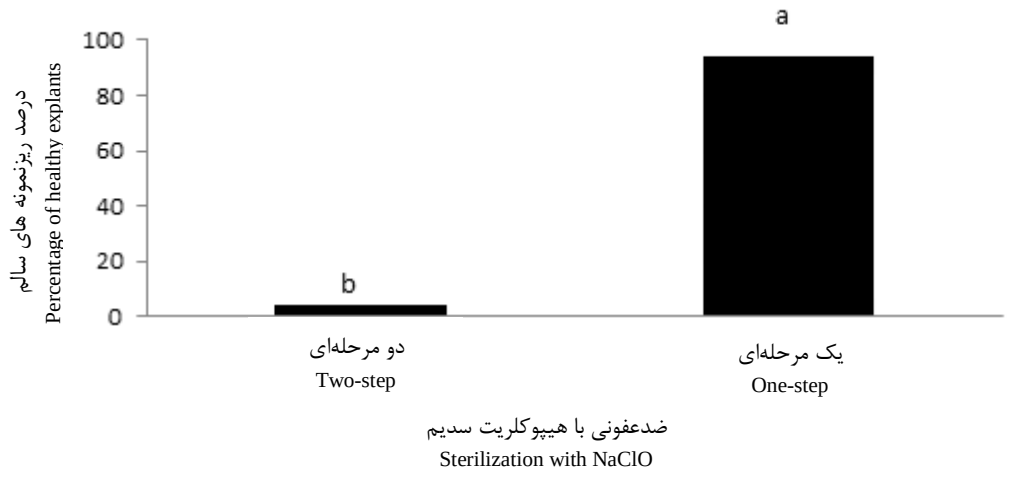
1. Force Ventilation

2. Oliviera

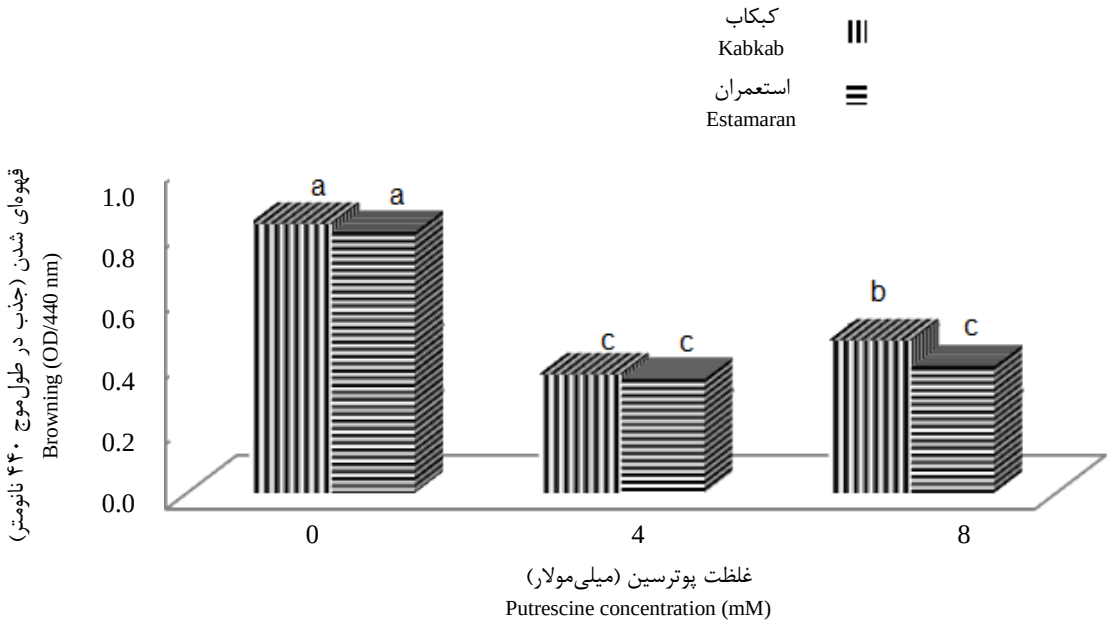


شکل ۱: A) نحوه قرار گرفتن صفحه مشبک جداکننده در محفظه کشت B) محفظه‌های کشت C) مخزن محیط‌کشت D) نمای کلی بیورآکتور E) ظروف کشت با فیلتر و بسته F) قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در سه سیستم کشت

Fig. 1: A) Fixing net frame in the bottom of culture chamber B) Cultures chambers C) Medium reservoir D) General view of the bioreactor E) Culture vessels with filter and sealed F) Browning the explants in three culture systems



شکل ۲: مقایسه دو روش یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های نخل خرما
Fig. 2: Comparison between one-step and two-step explant sterilization methods



شکل ۳: تأثیر پوترسین روی کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه دو رقم نخل خرما
Fig. 3: Effect of putrescine on reducing the explant browning in date palm

نتایج و بحث

اثر روش کاربرد هیپوکلریت سدیم بر میزان ضدعفونی سطحی

نتایج حاصل از این آزمایش معلوم کرد که روش ضدعفونی کردن ریزنمونه‌ها در یک مرحله با هیپوکلریت سدیم (وایتکس تجاری ۵۰٪) به‌همراه تکان‌دهی شدید بسیار مؤثرتر از ضدعفونی کردن ریزنمونه‌ها در دو مرحله با هیپوکلریت سدیم و بدون تکان‌دهی بود. درصد ریزنمونه‌های آلوده شده یا مرده در روش یک مرحله‌ای بسیار کم بوده در حدود ۴٪ است؛ اما در روش دو مرحله‌ای کاملاً برعکس بوده درصد آلودگی در حدود ۹۴٪ بود به‌عبارت‌دیگر تقریباً تمام ریزنمونه‌ها، آلوده شده یا مرده بودند (شکل ۲). علت این امر را می‌توان به دو دلیل توجیه کرد:

۱. تکان دادن ریزنمونه‌های درشت در وایتکس باعث نفوذ این ماده ضدعفونی‌کننده به لایه‌های سطحی گشته، عوامل بیماری‌زا را در این ناحیه از بین می‌برد. درحالی‌که در شرایط بدون تکان دهی، عوامل آلوده‌کننده به‌دلیل عدم نفوذ خوب وایتکس، در لایه‌های سطحی کمین کرده، به‌محض قرار گرفتن ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت و اتساع نسبی آن‌ها، عوامل

آلوده‌کننده به‌سرعت توسعه پیداکرده، باعث از بین رفتن ریزنمونه‌ها می‌گردند.

۲. قرار گرفتن ریزنمونه‌های با حجم کوچک‌تر برای بار دوم در معرض وایتکس احتمالاً باعث نفوذ بیشتر این ماده سمی به بافت‌های حساس درونی‌تر گشته و باعث صدمه به این بافت‌ها می‌گردد.

استفاده از وایتکس در یک مرحله به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت ضدعفونی بافت‌های مریستمی در نخل خرما برای اولین‌بار توسط *شارما*[1] و همکاران (1980) گزارش شده بود. پس از آن محققین زیادی نیز با موفقیت از این روش استفاده کردند.

اثر پوترسین بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که هر دو غلظت ۴ و ۸ میلی‌مولار پوترسین نسبت به شاهد باعث کاهش میزان قهوه‌ای شدن بافت ریز نمونه گردیدند و غلظت ۴ میلی‌مولار پوترسین نسبت به غلظت ۸ میلی‌مولار تأثیر بیشتری در کاهش میزان قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه داشت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نیز نشان داد که بین غلظت‌های مختلف و ارقام اختلاف معنی‌دار بوده اما اثرات متقابل غلظت در رقم معنی‌دار نبود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که غلظت ۴ میلی‌مولار پوترسین نسبت به غلظت ۸ میلی‌مولار و شاهد باعث کاهش بیشتر میزان قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه نخل خرما گردید (شکل ۳). *تانگ* و همکاران (2004) گزارش دادند که پوترسین و اسپرمیدین پس از ۳۵ روز باعث بازیافت پینه قهوه‌ای شده کاج به‌ترتیب به میزان ۱۹/۵۵ و ۱۸/۹۲ درصد گردیدند. ترکیبات پوترسین با اسپرمیدین و اسپرمین نیز باعث بازیافت پینه قهوه‌ای شده به‌ترتیب برابر با ۱۶/۶۸ و ۱۵/۶۲ درصد گردیدند اما ترکیب اسپرمیدین با اسپرمین تأثیر کمی داشت و فقط ۱/۳۲ درصد پینه‌های قهوه‌ای شده بازیافت شدند.

اثر غلظت محیط‌کشت بر قهوه‌ای شدن ریز نمونه

نتایج حاصل از آزمایش مقایسه و بررسی تأثیر غلظت نمک‌های محیط‌کشت (MS کامل، ½MS، ¼MS) بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما رقم استعمران (جدول ۲) نشان داد که اثر غلظت نمک‌های ماکرو محیط‌کشت MS بر میزان قهوه‌ای شدن در سطح ۵ درصد ($P<0.05$) معنی‌دار بوده است. شکل ۴ مقایسه میانگین با آزمون دانکن اثر غلظت نمک‌های محیط‌کشت MS بر میزان قهوه‌ای شدن را نشان می‌دهد. بیش‌ترین میزان قهوه‌ای شدن با میانگین جذب OD/440= ۰/۱۶۵۷۱nm برای MS¼ و کم‌ترین میزان قهوه‌ای شدن با میزان OD/440 = ۰/۰۳nm برای MS کامل مشاهده شد.

این نتایج مؤید نتایج به‌دست‌آمده توسط *التورکی* و همکاران (2013) می‌باشند. آن‌ها با مطالعه‌ی سه رقم خرما در چهار محیط‌کشت پایه (¼MS، ½MS، ¾MS و MS کامل) اثر احتمالی قدرت محیط را بر میزان فنول‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پینه خرما را بررسی کردند آن‌ها گزارش دادند که با کاهش غلظت محیط‌کشت، تولید مواد فنلی افزایش می‌یابد. به نظر می‌آید که بین قدرت محیط و تجمع متابولیت‌های ثانویه در بافت‌های ریزنمونه نخل خرما رابطه معکوس وجود دارد. این ممکن است ناشی از این واقعیت باشد که MS کامل عمدتاً متابولیسم‌های اولیه و رشد سلولی را بهبود بخشیده و از این طریق باعث رشد پینه و کاهش قهوه‌ای شدن گردید.

اثر عنصر روی بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش چهارم نشان داد که اثر غلطت و منبع روی بر میزان قهوه‌ای شدن، در سطح ۵ درصد دارای اثر معنی‌دار بود (جدول ۳). شکل ۵ مقایسه میانگین اثر نانوذرات اکسید و سولفات روی در غلظت‌های مختلف بر میزان قهوه‌ای شدن را نشان می‌دهد. بیش‌ترین میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در تیمار ۹/۷۲ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی (با میانگین جذب برابر با OD/440=۰/۰۸۵۸۶nm) و کم‌ترین آن در تیمار ۴/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر روی (با میانگین جذب برابر با OD/440=۰/۰۲۵۳۴nm) مشاهده شد. با توجه به نتایج آزمایش فوق، عنصر روی و نانواکسید روی در غلظت‌های مورد آزمایش اثرات متفاوتی بر میزان مواد فنلی و درنتیجه، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشت. باوجود این ملاحظه گردید که تیمارهای ۲/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر روی و ۲/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر نانواکسید روی اختلاف معنی‌داری ازلحاظ آماری نداشتند. به‌نظر می‌آید عنصر روی به‌خاطر خاصیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از سنتز اسیدآسکوربیک موجب کاهش مواد فنلی در پینه‌ها و محیط‌کشت گردید (وحدت‌پور و همکاران، ۱۳۸۸). *المور*[2] و همکاران (2004) نیز از اسیدآسکوربیک به‌عنوان ماده‌ی آنتی‌اکسیدانت و ضدقهوه‌ای شدن در کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی استفاده نموده‌اند.

1. Sharma

2. Elmore

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس تأثیر پوترسین در کاهش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما
Table 1: Analysis of variance of the effect of putrescine on reducing explant browning in date palm

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares میزان قهوه‌ای شدن Browning
غلظت Concentration	2	0.362***
رقم Cultivar	1	0.008*
غلظت × رقم Concentration × Cultivar	2	0.002ns
خطا Error	17	0.001
ضریب تغییرات CV		12

***، * و ns: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح ۵ درصد
***, * and ns: Significantly different at 1%, 5% and no significantly different at 5%, respectively

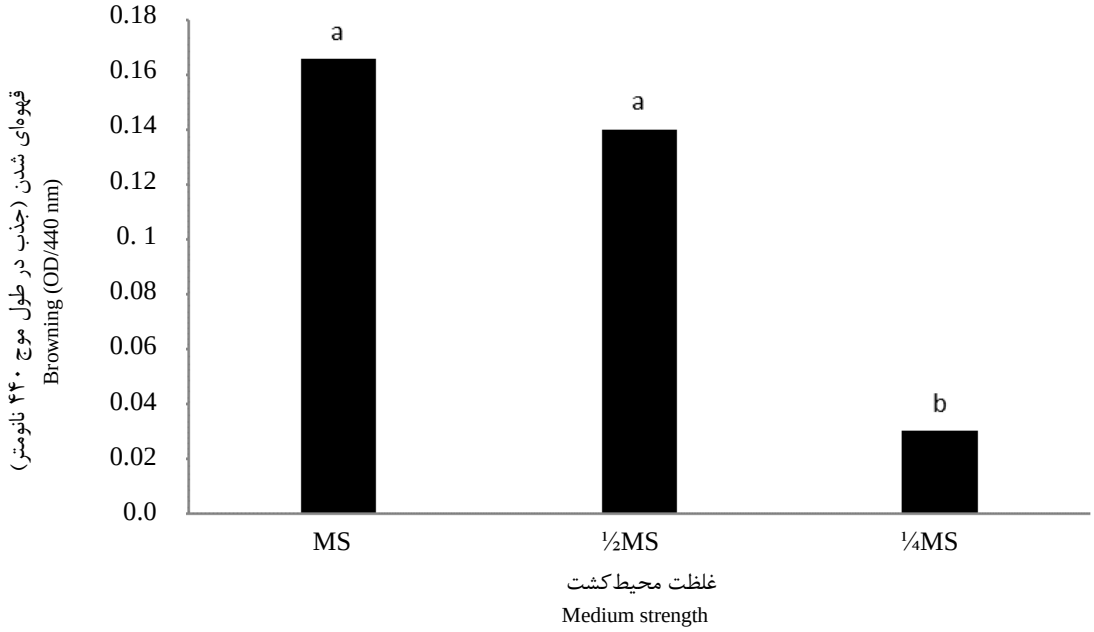
جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نمک‌های محیط‌کشت MS بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما
Table 2: Analysis of variance of the effect of MS strength on explant browning in date palm

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares میزان قهوه‌ای شدن Browning
غلظت محیط Medium strength	2	0.03637619*
خطا Error	18	0.01992063
ضریب تغییرات CV		12.6

*: در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد
*: Significantly different at 5%

هم‌چنین *هانگ*[1] و همکاران (2002) مشاهده کردند که با استفاده از اسید آسکوربیک می‌توان تا میزان زیادی از فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز که به‌شدت باعث قهوه‌ای شدن می‌گردد، ممانعت کرد. عامل مهم دیگر، میزان تحمل سلول‌هاست. زیرا نانوذرات اکسید روی تا غلظت ۲/۴۳ میلی‌گرم بر لیتر در پینه‌زایی اثر مثبت ولی در غلظت‌های بالاتر اثرات منفی داشتند. احتمالاً ریزنمونه‌ها به این غلظت متحمل بوده‌اند، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر برای سلول سمی بوده و منجر به قهوه‌ای شدن آن‌ها گردیده است. غلظت‌های کم فلز روی با القای سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند آنتوسیانین، فلاونویید و اسید آسکوربیک بر رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده غلبه می‌نماید. از طرفی همبستگی مثبتی بین فعالیت رادیکال‌های آزاد و غلظت کلی مواد فنلی در گیاه وجود دارد (*زنگ و وانگ*[2]، 2001؛ *واگنستین*[3] و همکاران، 2004؛ *الترکی* و همکاران، 2010). البته جذب، جابه‌جایی و تجمع نانوذرات بسته به گونه‌های گیاهی، نوع و ترکیب شیمیایی، ساختمان و استحکام نانوذرات متفاوت است (ریکو و همکاران، 2011).

1. Huang
2. Zeng and Wang
3. Wagensteen



شکل ۴: اثر غلظت محیط‌کشت MS بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه نخل خرما

Fig. 4: Effect of MS strength on explant browning in date palm

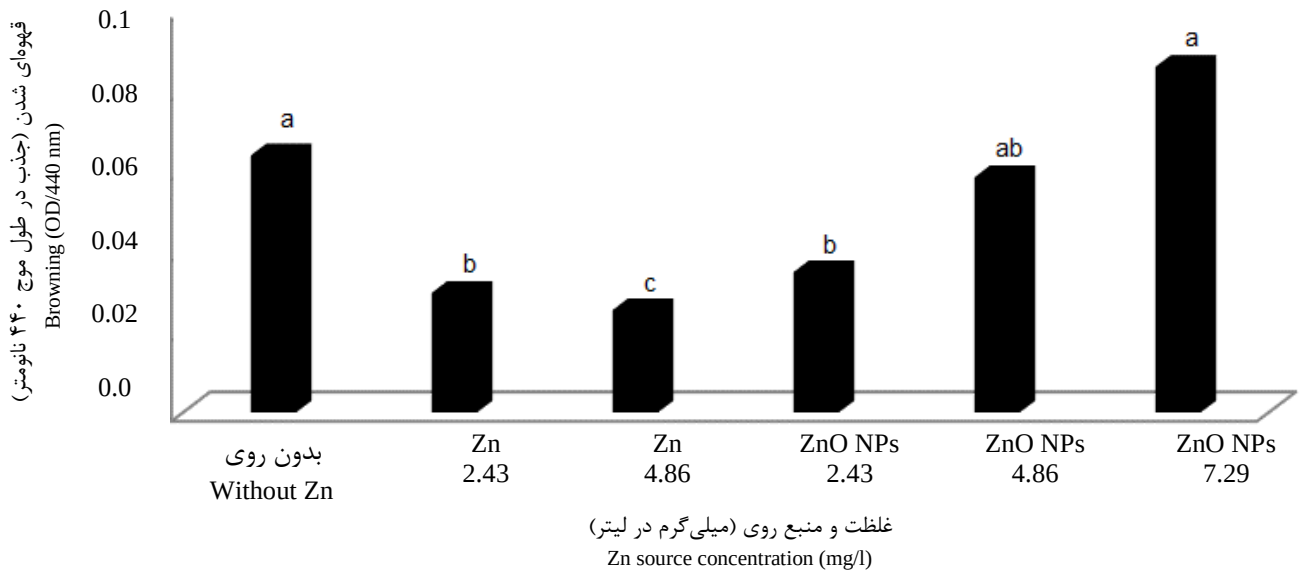
جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس اثر روی بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما

Table 3: Analysis of variance of the effect of Zn on explant browning in date palm

منابع تغییرات Sources of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares میزان قهوه‌ای شدن Browning
روی Zn	5	0.01082347*
خطا Error	36	0.01309932
ضریب تغییرات CV		13.1

*: در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد

*: Significantly different at 5%



شکل ۵: اثر غلظت و منبع روی بر میزان قهوه‌ای شدن کالوس

Fig. 5: Effect of Zn source and concentration on explant browning in date palm

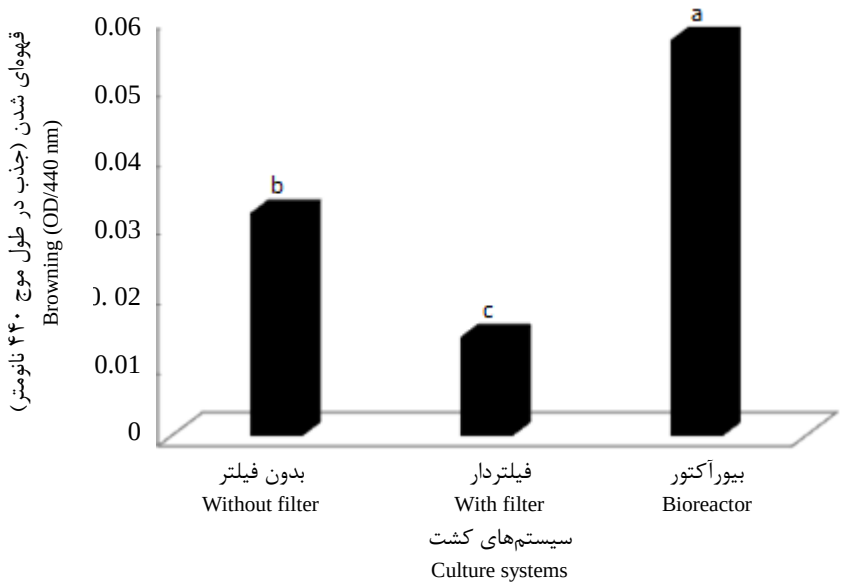
جدول ۴: نتایج تجزیه واریانس اثر سیستم‌های مختلف کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما

Table 4: Analysis of variance of the effect of culture systems on explant browning in date palm

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares میزان قهوه‌ای شدن Browning
سیستم کشت Culture system	2	0.00141168*
خطا Error	18	0.00003440
ضریب تغییرات CV		1.8

*: در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد

*: Significantly different at 5%



شکل ۶: اثر سیستم‌های مختلف کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها

Fig. 6: Effect of culture systems on explant browning in date palm

اثر سیستم کشت بر قهوه‌ای شدن ریزنمونه

تجزیه واریانس داده‌های حاصل آزمایش بررسی اثر سیستم‌های مختلف کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نشان داد که سیستم‌های مختلف کشت در سطح ۵ درصد ($P<0.05$) اثرات معنی‌داری بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشتند (جدول ۴). شکل ۶ مقایسه میانگین اثر سیستم‌های مختلف کشت را بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نشان می‌دهد. بیش‌ترین میزان قهوه‌ای شدن، با میانگین جذب برابر با nm OD/440=۰/۰۵۷ در سیستم بیورآکتور تناوبی و کم‌ترین میزان قهوه‌ای شدن با میانگین جذب برابر با OD/440=۰/۰۱۴۲۳۳nm در ظرف فیلتردار مشاهده گردید (شکل ۱F). *عثمانی*[1] و همکاران (2009b) گزارش مشابهی در مورد پینه‌زایی نخل خرما رقم دگلت بی[2] در بیورآکتور تناوبی ارائه داده بودند. آن‌ها در غالب یک آزمایش مقدماتی جهت القاء کالوس‌دهی نخل خرما متوجه شدند که پس از مدتی اغلب ریزنمونه‌های کشت شده در بیورآکتور تناوبی، قهوه‌ای شده و سپس مردند. البته نتایج این تحقیق به‌طور کامل با نتایج *کوزکی*[3] و همکاران (2002) بر روی کالوس‌زایی موز، رقم FHIA-18(AAAB) مغایرت داشت.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش معلوم گردید که امکان کاهش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های نخل خرما در شرایط درون شیشه‌ای تا حد زیادی با رعایت عوامل مختلف دخیل در کشت بافت میسر خواهد شد. غلظت نمک‌های ماکرو محیط‌کشت و روش تهویه تأثیر زیادی بر روی قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها داشتند. با توجه به این‌که تحریک پینه در نخل خرما فرآیند طولانی‌مدت می‌باشد بنابراین کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌های محتوی عناصر پرمصرف با غلظت کم باعث ایجاد تنش در ریزنمونه‌ها شده و از این طریق مشکل قهوه‌ای شدن بروز بیشتری می‌نماید. هم‌چنین از نتایج به‌دست‌آمده در آزمایش مقایسه سیستم‌های کشت معلوم گردید که کیپ بودن ظروف کشت به‌دلیل تجمع برخی مواد به‌صورت گاز یا بخار باعث افزایش مشکل قهوه‌ای شدن می‌گردد. از طرف دیگر تهویه زیادی ریزنمونه نیز احتمالاً به‌دلیل خشک شدن سریع سطح ریزنمونه‌ها و یا فراهم بودن اکسیژن زیاد نیز سبب افزایش قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها می‌گردد. در پایان پیشنهاد می‌گردد اثر عوامل دیگری نظیر مواد آنتی‌اکسیدانی، جنس ظرف کشت، شرایط نوری و غلظت چند برابر نمک‌های محیط‌کشت نیز موردبررسی قرار بگیرند.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب گرنت انجام شده است لذا از مسئولین محترم دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

امام، م. ۱۳۸۳. بررسی تکثیر غیرجنسی گردوی بالغ ایرانی (*Juglans regia*) با کشت سرشاخه‌های انتهایی. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، ۶۳: ۱۵-۱۰.

عصاره، م. ح. و زندی اصفهان، ا. ۱۳۸۶. بررسی عوامل مؤثر بر تراوش فنل‌ها در کشت بافت گونه‌های *Eucalyptus gunnii* و *E. viminalis*. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، ۷۷: ۱۹۰-۱۸۵.

Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C. and Ferriere, N. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic embryogenesis. Annals of Botany, 92: 613-623.

Al-Turki, S., Shahba, M. A. and Stuslinoff, C. 2010. Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits as affected by cultivar and location. Journal of Food Agriculture and Environment, 8: 253-260.

1. Othmani
2. Deglet Bey
3. Kosky

Al-Turki, S. M., Shehata, W. F. and Aldaej, M. I. 2013. Influence of nutrient medium on antioxidants production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars *in vitro*. Asian Journal of Plant Sciences, 12 (3): 119-127.

Beauchesne, G., Zaid, A. and Rahiss, A. 1986. Meristematic potentialities of bottom of young leaves to rapidly propagate date palm. Second Symposium on date palm. Saudi Arabia, 3-6 March: 87-95.

El Bellaj, M. and El Hadrami, I. 2004. Characterization of two non-constitutive hydroxycinnamic acid derivatives in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) callus in relation with tissue browning. Biotechnology, 3 (2): 155-159.

Elmore, H., Samples, B., Sharma, S. and Harrison, M. 2004. Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 20: 131-135.

Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C. and Constantinides, S. M. 1981. Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidasees (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). Journal of Food Science, 46: 150-155.

Huang, L. C., Lee, Y. L., Huang, B. L., Kou, C. I. and Shaw, J. F. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. In Vitro Cellular and Development Biology Plant, 38: 358-365.

Marshall, M. R., Kim, J. and Wei, C. 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. FAO Report at http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMEFINAL/ p: 49 (12/08/2011).

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Oliviera, S. L. D., Guerra, N. B., Maciel, M. I. S. and Livera, A. V. S. 1994. Polyphenoloxidase activity, polyphenols concentration and browning intensity during soursop (*Annona muricata* L.) maturation. Journal of Food Science, 59 (5): 1050-1052.

Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N. and Trifi, M. 2009. *In vitro* cloning of date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). Biotechnology and Biotechnological Equipment, 23 (2): 1181-1188.

Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. 2011. Interaction of nanoparticles with edible pants and their possible implications in the food chain. Journal of Agricultural and Food. Chemistry, 59: 3485-3498.

Shaheen, M. A. 1990. Propagation of date palm through tissue culture: A review and an interpretation. Annals of Agricultural Science, 35 (2): 895-909.

Sharma, D. R., Kumari, R. and Chowdhury, B. 1980. *In vitro* culture of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissues. Euphytica, 29: 169-174.

Tang, W., Newton, R. J. and Outhavong, V. 2004. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. Physiologia Plantarum, 22 (3): 386-395.

Tisserat, B. 1979a. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. Journal of Experimental Botany, 30: 1275-1283.

Tisserat, B. 1979b. Tissue culture of date palms. Plant Tissue Culture Manual C_2. Kluwer academic publisher, Netherlands, 1-14.

Tisserat, B. 1991. Clonal propagation of palm. Journal of Heredity, 70: 221-222.

Wagensteen, H., Samuelsen, A. B. and Malterrud, K. E. 2004. Antioxidant activity in extracts coriander. Food Chemistry, 88: 293-297.

Zaid, A. 1984. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures. Date Palm Journal, 3 (1): 269-275.

Zaid, A. 1986. Review of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissue culture. Second Symposium on Date Palm. King Faisal University. Al-Hassa, Saudi Arabia, 67-75.

Zaid, A. and Tisserat, B. 1983a. *In vitro* shoot tip differentiation in *Phoenix dactylifera* L., Date Palm Journal, 2 (2): 163-182.

Zheng, W. and Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 5165-5170.

Zouine, J. and El Hadrami, I. 2004. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L.: Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugars, phenolics and peroxidase activities during the embryogenic cell suspension culture. Biotechnology, 3 (2): 114-118.

The Effect of Various Factors on Browning of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Explant *In Vitro*

Amiri[1], H., Mousavi[2*], M. and Torahi[3], A.

Abstract

Explant browning is the main problem in date palm tissue culture. This study was conducted to investigate the effect of various factors on browning of date palm explants, by five independent experiment including surface sterilization of explants with sodium hypochlorite (one-step vs. two-step), controlling explants browning through putrescine application (0, 4 and 8mM), medium strength (full, 1/2, 1/4MS), Zn source and concentration (MS without Zn, MS + 2.43 and 4.86 mg/l bulk Zn, MS+ 2.43, 4.86 and 9.72 mg/l ZnO nanoparticles) and culture systems (Temporary Immersion Bioreactor, vessel with filter on lid, and sealed vessel). Results showed that the best method for explants sterilization was one-step sterilization for 20min. with vigorous shaking. For browning reduction, the best results were obtained with 4mM putrescine, full MS strength, MS + 4.86 mg/l bulk Zn and culture in vessels with filters on lids.

Keywords: Sodium hypochlorid, Zn sulphate, Putrescine, ZnO nanoparticles, Temporary Immersion Bioreactor

1 and 2. MSc Graduated Student and Assistant Professor, Respectively, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3. Academic Member of the Date Palm and Tropical Fruits Research Institute, Ahvaz, Iran

*: Corresponding author Email: mousa_mousawi@yahoo.com