



دانشگاه گیلان

مجله پژوهش‌های تولید گیاهی  
جلد شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۸۸  
www.gau.ac.ir/journals

## بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی زردچوبه در مقایسه با زغال فعال و اسید آسکوربیک در محیط کشت کالوس گیاه نارون چینی (*Ulmus parvifolia* Jasq.)

فهیمه وحدت‌پور<sup>۱</sup>، \* کامبیز مشایخی<sup>۲</sup> و مینا پیری‌زیرکوهی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

<sup>۲</sup> دانشیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۱؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۲۸

### چکیده

استفاده از زردچوبه به‌عنوان ماده‌ای آنتی‌اکسیدانت مدت‌هاست که در مبحث پزشکی و سلامتی انسان مطرح می‌باشد، اما تاکنون در کشت بافت از آن استفاده نشده است. قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی اغلب به دنبال صدمه دیدن بافت و به‌وسیله آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز صورت می‌گیرد که باعث ایجاد ضایعات بیشتر در بافت‌های گیاهی می‌گردد. در اکثر موارد برای کاهش قهوه‌ای شدن آن‌ها را در محیط حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها کشت می‌نمایند. این مواد شامل اسید آسکوربیک، سدیم دی‌تیل‌دیتیو کاربامات، پلی‌ونیل‌پیرولیدون، زغال فعال و غیره می‌باشد. در این آزمایش امکان استفاده از زردچوبه به جای سایر مواد آنتی‌اکسیدان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از سه ماده آنتی‌اکسیدانی زردچوبه، زغال فعال، اسید آسکوربیک در محیط کشت دارای کالوس قهوه‌ای رنگ نارون چینی *Ulmus parvifolia* Jasq. استفاده گردید. کالوس‌های مادری که به ابعاد ۳-۵ میلی‌متری تقسیم‌بندی شده بودند در محیط کشت MS جامد، حاوی ۲۵ درصد شیره نارگیل و ۰/۸ درصد آگار واکشت گردیدند. تیمارها شامل آنتی‌اکسیدانت‌های زغال فعال، زردچوبه و اسید آسکوربیک، هر کدام در سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد بود که در مجموع ۹ تیمار را شامل گردید. آنالیز داده‌ها نشان داد

\* مسئول مکاتبه: kambizm@yahoo.com

که افزایش رشد کالوس در تیمار حاوی اسید آسکوربیک با غلظت ۱ درصد و تیمار زردچوبه با غلظت ۰/۱ درصد به‌طور معنی‌داری بیشترین مقدار بود، در حالی‌که شدت رشد کالوس‌ها در تیمارهای زغال فعال با غلظت ۰/۵ و ۱ درصد و زردچوبه با غلظت ۰/۵ درصد در سطح ۵ درصد نسبت به تیمارهای ذکر شده، کاهش معنی‌داری نشان داد. این سه تیمار بیشترین اثر را بر رشد کالوس‌ها داشته و بین آن‌ها از این لحاظ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌اکسیدان، کشت بافت، زردچوبه، نارون چینی

### مقدمه

نارون چینی *Ulmus parvifolia* Jasq یکی از گونه‌های حائز اهمیت در جنگل‌های ایران می‌باشد. این گونه در حال حاضر به‌دلیل ابتلا به بیماری‌های قارچی در معرض خطر انقراض است. به تازگی از روش‌های نوین و تکنیک‌های کشت بافت برای تشخیص و کنترل این بیماری استفاده می‌شود (ممقانی و مشایخی، ۲۰۰۷). یکی از این روش‌ها کشت کالوس می‌باشد، البته کالوس‌زایی، تکثیر و نگهداری کالوس با مسایل و مشکلات مختلفی همراه است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها قهوه‌ای شدن کالوس می‌باشد که از رشد نمونه مورد کشت به مقدار زیاد جلوگیری می‌نماید. در مقایسه با گیاهان علفی این قهوه‌ای شدن در گیاهان چوبی بیشتر دیده می‌شود (باقری و همکاران، ۲۰۰۴).

قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی اغلب به دنبال صدمه دیدن آن‌ها ایجاد می‌گردد و عموماً نتیجه آن نیز از بین رفتن نمونه مورد کشت می‌باشد. به‌طور کلی قهوه‌ای شدن در گیاهان به‌وسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) صورت می‌گیرد (مارکس و سیمسون، ۱۹۹۰؛ ون و دوک، ۱۹۸۴). که در پلاست‌های سلول‌های گیاهی قرار دارد. پیش ماده فنولی این آنزیم در واکنش‌های سلول‌های گیاهی ذخیره می‌شود و بدین‌وسیله حضور جداگانه این مواد در واکنش‌ها از واکنش قهوه‌ای شدن جلوگیری می‌نمایند، در صورت ورود آسیب به سلول‌های گیاهی این آنزیم و پیش‌ماده آن با هم مخلوط می‌گردند و قهوه‌ای شدن در بافت رخ می‌دهد. اگر میزان این آنزیم کاهش یابد، از میزان قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی نیز کاسته می‌شود. جهت جلوگیری از چنین پدیده‌ای می‌توان از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند اسید آسکوربیک، اسید سیتریک، ۱ و ۴ دی‌تیوتریتول و مرکاپتواتانول استفاده نمود (هوآنگ و همکاران، ۲۰۰۲).

ریزنمونه‌های بعضی از گونه‌های گیاهی اغلب بعد از ۳-۵ روز قرارگیری در محیط کشت، قهوه‌ای رنگ می‌شوند و هنگام بروز چنین حالتی اغلب رشد متوقف و بافت گیاهی از بین می‌رود. قهوه‌ای شدن

بافت بیشتر در گونه‌هایی دیده می‌شود که حاوی مقدار زیادی تانن یا دیگر هیدروکسی فنول‌ها باشند. البته بافت‌های جوان کمتر از بافت‌های پیر در معرض این عارضه قرار می‌گیرند. در کشت پروتوپلاست نیز قهوه‌ای شدن مشکل اصلی بازدارنده رشد و نمو و تکثیر پروتوپلاست است (احسان پور و امینی، ۲۰۰۱). غیر از عوامل آنزیمی، عوامل دیگری چون فاسد بودن آگار مورد استفاده، اتوکلاو نادرست، به شدت قلیایی یا اسیدی بودن محیط کشت نیز ممکن است باعث قهوه‌ای شدن نمونه‌ها در محیط‌های کشت بافت گردند (احسان پور و امینی، ۲۰۰۱). فصل جداسازی نمونه و موقعیت بافت در گیاه نیز بر روی این پدیده بی‌تأثیر نیست (باقری و همکاران، ۲۰۰۴). در ریزنمونه‌های حاصل از بخش‌های بالایی نسبت به بخش‌های پایین‌تر درختان ۸ تا ۱۰ ساله *Eucalyptus tereticornis* تراوش فنلی شدیدتر و میزان ایجاد ساقه کمتر است (سان و هال، ۱۹۹۰).

کیانی فریز و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی خود بر روی گیاه زیتون نشان دادند که کاهش غلظت عناصر غذایی در محیط کشت منجر به کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌گردد. برای کاهش قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی و جلوگیری از اثرات نامطلوب آن از روش‌های زیر می‌توان استفاده کرد:

۱. واکشت مکرر به‌عنوان متداول‌ترین روش (باقری و همکاران، ۲۰۰۴).
۲. قهوه‌ای شدن توسط نور افزایش می‌یابد. می‌توان به‌وسیله کاغذ آلومینیومی قاعده لوله آزمایش را پوشاند (احسان پور و امینی، ۲۰۰۱) و یا گیاه را قبل از برش به مدت چند هفته در تاریکی یا نور کم نگهداری نمود. به‌طور مثال نگهداری گیاهان *Acer platanoides* و *Quercus robur* در تاریکی، قهوه‌ای شدن بافت را در شرایط کشت درون شیشه‌ای کاهش داد (مارکس و سیمسون، ۱۹۹۰).
۳. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، غالباً برای کاهش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها را هنگام برش در تماس با آنتی‌اکسیدان‌ها قرار می‌دهند. پلی‌ونیل‌پیرولیدون<sup>۱</sup> (PVP) یکی از مؤثرترین آنتی‌اکسیدان‌ها است (باقری و همکاران، ۲۰۰۴). از این ماده در طی برش ریزنمونه‌های ساقه نراد (*Abies balsamea*)، پیسه‌آ (*Picea glauca*) (بونکا، ۱۹۸۱) و کاج نقره‌ای (*Pinus sylvestris*) (هوتولا، ۱۹۸۸) استفاده شده است. غوطه‌ور ساختن بافت‌های نخل خرما (*Phoenix dactylifera*) قبل از ضدعفونی سطحی (زید و تیسرات، ۱۹۸۳) و اوکالیپتوس (*Eucalyptus ficifolia*) قبل از برش

ریزنمونه (باقری و همکاران، ۲۰۰۴) در محلول آنتی‌اکسیدان به مدت چند ساعت قهوه‌ای شدن بافت را کاهش داد. برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن می‌توان به محیط کشت، آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر اسید آسکوربیک، اسید سیتریک، سیستئین، هیدروکلراید، او ۴-دی‌تیوتریتول، گلوکاتئون و مرکاپتواتانول را افزود (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱). بهتر است برای استریل این مواد از فیلتراسیون (با منافذ ۰/۲۲) استفاده شود تا خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها که در اثر اتوکلاو کردن از بین می‌رود یا کاهش می‌یابد، حفظ گردد (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱). اسید آسکوربیک در محیط کشت بسیار ناپایدار است اما برخی از فرآورده‌های تجزیه شده آن نیز نقش آنتی‌اکسیدانی را به خوبی انجام می‌دهند (المور و همکاران، ۱۹۹۰).

۴. خیساندن ریزنمونه در آب پس از برش (باقری و همکاران، ۲۰۰۴)، نگهداری ریزنمونه‌های نراد (*Abies balsamea*)، پیسه‌آ (*Picea glauca*) و شاه‌بلوط (*Castanea sativa*) به صورت غوطه‌ور در آب طی عمل برش (وییتز و همکاران، ۱۹۸۳) و استفاده از تیمار سرمادهی در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱).

۵. افزودن اسید آمینه گلوتامین، آرژنین و آسپارژین به محیط کشت

۶. استفاده از محیط کشت مایع که ترکیبات فنلی و تولیدات سمی را رقیق‌تر می‌کند (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱).

۷. جلوگیری از زخمی شدن زیاد ریزنمونه

۸. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت مثل توفوردی<sup>۱</sup> و ایندول استیک اسید<sup>۲</sup> که سنتز مواد فنلی را به تأخیر می‌اندازند (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱).

۹. پوشاندن انتهای برش ریزنمونه‌ها توسط پارافین به عنوان یک تکنیک جدید در کشت بافت (بات و دار، ۲۰۰۴).

قهوه‌ای شدن تنها اثر زخمی شدن نیست. زخمی شدن باعث ناپایداری غشاها شده که منجر به تراوش سریع پتاسیم از سلول می‌گردد (المور و همکاران، ۱۹۹۰). به عنوان مثال، حذف دیواره سلولی طی عمل تشکیل پروتوپلاست در گیاه افرا (*Acer pseudoplatanus*) به تراوش پتاسیم منجر شد (کورنل و همکاران، ۱۹۸۳). خسارت غشای زخمی شده می‌تواند با قرار گرفتن بافت‌ها در معرض پلی‌آمین‌ها کاهش یابد (آلمن، ۱۹۸۲). قهوه‌ای شدن بافت‌ها متابولیسم آن‌ها را به صورت‌های مختلف

1- 2,4-D

2- IAA

تحت تأثیر قرار می‌دهد. مثلاً در کشت‌های کالوس کاج نقره‌ای (*Pinus sylverstris*) شروع قهوه‌ای شدن با افزایش سنتز پروتئین و نشاسته همراه بود. در این بررسی پس از آن‌که قهوه‌ای شدن شدیدتر گردید و سنتز پروتئین کاهش یافته و تخریب بافت‌ها شروع گردید (لیندفورس و همکاران، ۱۹۹۰). قهوه‌ای شدن بافت‌ها اتوکاتالیزور است. تراوش‌های سمی فنلی موجب جراحت شده و در نتیجه باعث افزایش تراوش می‌شود که منجر به افزایش قهوه‌ای شدن می‌گردد. برای جلوگیری از این تراوش‌ها می‌توان به محیط زغال فعال اضافه کرد. از اثرات منفی کاربرد زغال فعال جذب هورمون‌های رشد می‌باشد که از این طریق مانع تأثیر این مواد می‌شود (وترهد و همکاران، ۱۹۷۹). هم‌چنین زغال فعال پس از اتوکلاو pH محیط را کاهش می‌دهد (مانتیوس و بن، ۱۹۸۵؛ پن و استادان، ۱۹۹۹).

زرد چوبه *Curcuma longa L.* از خانواده *Zingiberaceae* گیاهی است چند ساله با ارتفاع ۱ متر که بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری انتشار دارد و در کشورهای چین و هند به‌طور گسترده‌ای کشت می‌شود. ریزوم‌های آن به شکل مستطیل و گاهی گلابی شکل، با انشعابات کوتاه می‌باشد. زردچوبه به‌عنوان طعم‌دهنده اغلب به‌صورت پودر مورد استفاده قرار می‌گیرد. پودر آن به **turmeric** معروف است (گویندراجان، ۱۹۸۰). در هند برای درمان سرفه، دیابت، هیپاتیت، روماتیسم و سینوزیت به‌کار می‌رود (آمون و همکاران، ۱۹۹۲). کورکومین که از ریشه زردچوبه استخراج شد. مسئول رنگ زرد آن می‌باشد و در طب سنتی از آن برای درمان رگ به رگ شدن و تورم در نواحی آسیب‌دیده به‌کار می‌رود (آمون و وال، ۱۹۹۱). در چین از آن به‌عنوان درمان درد شکم و هم‌چنین در تشریفات مذهبی از آن استفاده می‌شده است (آرجو و لیون، ۲۰۰۱). این ماده دارای اثرات ضدباکتری، ضدویروس، خواص آنتی‌اکسیدانی و غیره می‌باشد. ترکیب اصلی آن که توسط راگلی و ویتینگ کشف گردید کورکومین است و مسئول بیشتر اعمال فیزیولوژیک زردچوبه می‌باشد (روگلسی و ویتینگ، ۱۹۷۳). این ماده در دمای ۱۷۷-۱۷۶ درجه سانتی‌گراد ذوب می‌شود و به‌صورت نمک قرمز- قهوه‌ای در می‌آید. کورکومین در اتانول، کتون اسید استیک و کلروفرم قابل حل و در آب نامحلول می‌باشد. زنجیره اصلی آن آلیفاتیک است و گروه‌های آریل در آن جایگزین می‌شود. بررسی‌ها نشان داد که اگر دارو در محل صدمه دیده تزریق گردد هیچ‌گونه التهابی مشاهده نمی‌گردد که شاید به‌خاطر بازدارنده‌های التهاب در کورکومینوئیدها باشد. هم‌چنین گزارش شده که عصاره‌ای که توسط اتانول از زردچوبه استخراج می‌شود از رشد درون شیشه‌ای پارازیت‌های عامل التهاب جلوگیری می‌نماید (آرجو و لیون، ۲۰۰۱). هم‌چنین کورکومین مانع رونویسی پروتئین عامل ایدز می‌گردد (ایگنر و اسکولز،

۱۹۹۹). از طرف دیگر موجب کاهش کلسترول خون و ضدالتهاب کبد (در بدن موش) می‌باشد (چانگ و همکاران، ۲۰۰۰). لازم به ذکر می‌باشد که زردچوبه به‌عنوان ماده‌ای ضد‌موتاسیون و جهش‌شناسایی شده است. از مشتقات زردچوبه می‌توان به کورکومین<sup>۱</sup> (دارای خاصیت بیولوژیک ضدویروس ایدز، ضدباکتری، آنتی‌تومور و آنتی‌اکسیدانت)، آر‌تورمرن<sup>۲</sup> (برای رفع مارگزیدگی)، متیل‌کورکومین<sup>۳</sup> (آنتی‌باکتریال)، دی‌متوکسی‌کورکومین<sup>۴</sup> (آنتی‌اکسیدانت)، بیس‌دی‌متوکسی‌کورکوما<sup>۵</sup> (آنتی‌اکسیدانت) و سدیم‌کورمینات<sup>۶</sup> (ضدالتهاب) اشاره نمود (اسکارتزینی و اسپرونی، ۲۰۰۰).  
آنی‌کریشنان و رأوو (۱۹۹۵) روی خواص آنتی‌اکسیدانی کورکومین و مشتقات آن مطالعه کردند. این مواد در غلظت ۰/۰۸ میلی‌مول، از اکسیداسیون هموگلوبین جلوگیری می‌کنند. کورکومین با نگهداشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلو‌تاتیون پراکسیداز در سطح بالا، می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش دهد. از طرفی این ماده قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوده که اهمیت آن‌ها را در شروع اکسیداسیون لیپیدها نمی‌توان نادیده گرفت (پولاردی و لاکش، ۱۹۹۲).

### مواد و روش‌ها

در این آزمایش جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی زغال فعال، اسید آسکوربیک و زردچوبه، از کالوس‌های قهوه‌ای رنگ و تیره نارون چینی (*Ulmus parvifolia* Jasq.) که حدود ۵ ماهه بودند، استفاده شد. این کالوس‌ها از ریزنمونه‌های گرفته شده از شاخه‌های درخت نارون، در محیط کشت موراشی و اسکوگ<sup>۷</sup> حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به‌دست آمده بودند. کالوس‌ها در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند (آمون و همکاران، ۱۹۹۲). کالوس مادری به ابعاد ۳-۵ میلی‌متری تقسیم‌بندی شدند و سپس در محیط کشت جامد، که صرفاً حاوی نمک‌های پایه MS، ۲۵ درصد شیر نارگیل و ۰/۸ درصد آگار واکشت گردیدند. تیمارها شامل تیمار زغال فعال، زردچوبه و اسید آسکوربیک هر کدام در سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد بودند.

- 1- Curcumin
- 2- Ar-Turmerone
- 3- Methyl Curcumin
- 4- Dimethoxy Curcumin
- 5- Bisdemethoxy Curcuma
- 6- Sodium Curcuminat
- 7- Murashii and Skoog

pH محیط کشت با استفاده از سود ۰/۲ نرمال و اسید کلریدریک ۱ نرمال، قبل از اتوکلاو روی ۵/۵ تنظیم شد. در این آزمایش در هر ظرف مک‌کارتی مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت و یک قسمت از کالوس مادری قرار داده شد. برای هر تیمار ۴ تکرار و در نهایت ۳۶ واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. زغال فعال و زردچوبه در غلظت‌های ذکر شده در جدول شماره ۱، قبل از اتوکلاو به محیط کشت اضافه گردید، ولی اسید آسکوربیک به دلیل عدم پایداری آن به دمای بالا، بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت، زیر هود و زمانی که دمای محیط به ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید توسط استریلیزاسیون فیلتری، به محیط کشت اضافه شد. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۳ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. تمام مراحل کشت زیر هود استریل و با استفاده از مواد و وسایل استریل انجام گردید. وزن مربوط به کالوس درون هر شیشه مک‌کارتی پس از کشت مشخص گردید. این بررسی بر روی کالوس‌های نارون در آزمایشگاه، به صورت آزمایش‌های مشابه و جداگانه، دو بار انجام شد و مشاهدات مشابهی به دست آمد.

کالوس‌ها به مدت ۲ ماه در اتاق رشد با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. پس از طی این مدت کالوس‌ها را وزن کرده و وزن ثانویه به دست آمد، که با محاسبه اختلاف وزن ثانویه از وزن اولیه میزان افزایش وزن کالوس در هر تیمار محاسبه گردید. داده‌های حاصل از اختلاف وزن کالوس‌ها، در نرم‌افزار EXCEL ثبت گردید. داده‌ها در طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این بررسی مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد (سلطانی، ۱۹۹۸).

جدول ۱- ترکیب محیط کشت مورد استفاده در کشت کالوس.

تیما	غلظت و ترکیب محیط کشت
۱	۰/۱ درصد زغال فعال
۲	۰/۵ درصد زغال فعال
۳	۱ درصد زغال فعال
۴	۰/۱ درصد زردچوبه
۵	۰/۵ درصد زردچوبه
۶	۱ درصد زردچوبه
۷	۰/۱ درصد اسید آسکوربیک
۸	۰/۵ درصد اسید آسکوربیک
۹	۱ درصد اسید آسکوربیک

## نتایج

آنالیز داده‌ها نشان داد که کاربرد تیمارها بر روی وزن کالوس‌ها، دارای اثر معنی‌دار است (جدول ۲). هم‌چنین مقایسه میانگین ضریب تغییرات داده‌ها نیز نشان داد که بالاترین میزان افزایش وزن کالوس مربوط به تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک با غلظت ۱ درصد و زردچوبه با غلظت ۰/۱ درصد می‌باشد (جدول ۳). تیمارهای ذکر شده اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد، نسبت به تیمارهای زغال فعال با غلظت ۰/۵ و ۱ درصد و زردچوبه با غلظت ۰/۵ درصد نشان داده و نسبت به بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشد. این دو تیمار بیشترین اثر را بر افزایش وزن کالوس داشته و بین آنها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. رشد کالوس در محیط دارای زغال فعال با غلظت ۰/۱ کمتر از دو تیمار مذکور بوده اگرچه اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود ندارد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسید آسکوربیک در محیط کشت، افزایش رشد در کالوس مشاهده می‌گردد، به طوری که افزایش رشد کالوس در غلظت ۱ درصد به بیشترین حد خود رسید، اگرچه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین سه سطح اسید آسکوربیک دیده نمی‌شود (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مربوط به مقدار کالوس تولیدی در محیط‌های مختلف.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات رشد کالوس
تیمار	۸	۳۹۳/۳۱۹*
خطا	۲۴	۱۳۰/۱۹۹

کاربرد زردچوبه در غلظت ۰/۱ درصد از نظر افزایش رشد کالوس، اختلاف معنی‌داری با غلظت ۰/۵ نشان داد، هر چند که با غلظت ۱ درصد، در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد (جدول ۳). در مورد زغال فعال نیز اختلاف معنی‌داری بین سه سطح به کار رفته وجود ندارد. هم‌چنین اکثر تیمارها از نظر آماری در یک سطح بوده و کمترین میزان افزایش وزن مربوط به تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد زغال فعال و تیمار ۰/۵ درصد زردچوبه می‌باشد (جدول ۱).

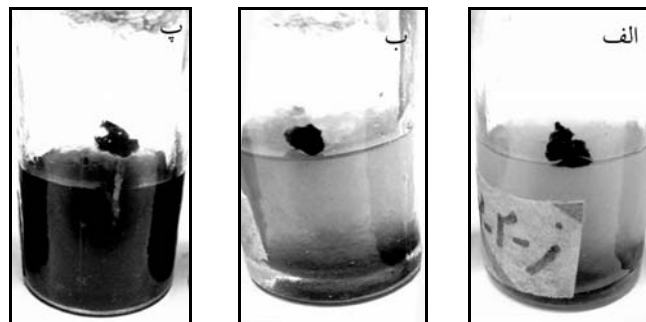


## فهیمه وحدت‌پور و همکاران

جدول ۳- مقایسه میانگین رشد کالوس در تیمارهای مختلف.

تیمار	میانگین وزن کالوس تولیدی هر تیمار (میلی‌گرم)	ضریب تغییرات
۰/۱ درصد زغال فعال	۴۸ <sup>ab</sup>	۲۸/۷
۰/۵ درصد زغال فعال	۳۲/۵ <sup>bc</sup>	
۱ درصد زغال فعال	۳۲/۰۰ <sup>bc</sup>	
۰/۱ درصد زردچوبه	۵۲/۷۵ <sup>a</sup>	
۰/۵ درصد زردچوبه	۲۶/۰۰ <sup>c</sup>	
۱ درصد زردچوبه	۳۷/۰۰ <sup>abc</sup>	
۰/۱ درصد اسید آسکوربیک	۳۷/۰۰ <sup>abc</sup>	
۰/۵ درصد اسید آسکوربیک	۴۱/۰۰ <sup>abc</sup>	
۱ درصد اسید آسکوربیک	۵۵/۰۰ <sup>a</sup>	
CV	۲۸/۷	

\*حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۱- عکس‌برداری بعد از ۴ هفته انجام شده است. الف) کالوس در محیط حاوی ۰/۱ درصد زردچوبه، ب) کالوس در محیط حاوی ۰/۵ درصد زردچوبه، پ) کالوس در محیط حاوی ۱ درصد زغال فعال. با مقایسه این سه محیط، بزرگ‌تر بودن کالوس در محیط الف نسبت به محیط‌های ب و پ مشخص می‌باشد.

### بحث

طبق بررسی‌هایی که طی دوره نگهداری کالوس‌ها در این آزمایش به عمل آمد، در اثر کاربرد اسید آسکوربیک، رنگ تیره کالوس‌ها تا حدود زیادی مرتفع شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک موجب کاهش مواد فنلی در کالوس‌ها و محیط کشت گردید و عکس‌العمل کالوس‌ها به این ماده بسیار سریع‌تر از دیگر تیمارها بود. این واکنش در غلظت بالای اسید آسکوربیک آشکارتر بود. جهت استریل اسید آسکوربیک با هدف استفاده از آن در محیط کشت از روش فیلتراسیون استفاده گردید، زیرا این ماده در اثر دما خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را از دست می‌دهد.

تیمار اسید اسکوربیک در غلظت ۱ درصد بیشترین رشد کالوس را نشان داد. در بررسی که هوآنگ و همکاران (۲۰۰۲) انجام دادند، مشاهده شد که فعالیت آنزیم PPO در pH برابر با ۱۰ ثبات می‌یابد و به شدت باعث قهوه‌ای شدن می‌گردد که با استفاده از اسید اسکوربیک از بروز این مسأله به میزان زیادی ممانعت به عمل آمد و با نتایج بررسی حاضر در مورد اسید اسکوربیک مطابقت داشت، به این صورت که در محیط دارای اسید اسکوربیک با غلظت ۱ درصد، بیشترین میزان رشد کالوس یعنی ۵۵ میلی‌گرم مشاهده گردید. از طرفی با کاربرد این ماده در محیط کشت بلافاصله از شدت قهوه‌ای شدن کاسته شد و رنگ کالوس‌ها روشن گردید که البته بعد از مدتی به علت کم شدن قدرت آنتی‌اکسیداتی اسید اسکوربیک این فرایند متوقف گردید (هوآنگ و همکاران، ۲۰۰۲). المور و همکاران (۲۰۰۴) نیز از اسید اسکوربیک به عنوان ماده‌ای آنتی‌اکسیدانت و ضدقهوه‌ای شدن در کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی استفاده نمودند.

در تیمارهای حاوی زغال فعال با غلظت ۰/۱ درصد رشد کالوس بیشتر می‌باشد. اثر مثبت زغال فعال روی رشد به دلیل جذب مواد فنلی از محیط کشت می‌باشد. تیسرات (۱۹۷۹) در جریان تکثیر درون شیشه‌ای خرما (*Phoenix dactylifera*) مشاهده کرد که با استفاده از زغال فعال، از طریق کاهش قهوه‌ای شدن، شرایط برای رشد مساعد گردید. کاهش رشد کالوس در غلظت بیشتر زغال فعال ممکن است به این دلیل باشد که زغال علاوه بر محصولات اکسیداسیونی فنلی باعث جذب بعضی از ترکیبات مانند تنظیم‌کننده‌های رشد که برای رشد ضروری می‌باشند نیز می‌گردد که نکته‌ای منفی برای آن به شمار می‌آید (مارکس و سیمسون، ۱۹۹۰). هم‌چنین زغال فعال، ویتامین‌های تیامین و اسید نیکوتینیک، را از محیط حذف می‌کند (وترلند و همکاران، ۱۹۷۹). با افزودن زغال به محیط کشت pH محیط بعد از اتوکلاو کاهش یافته و باعث کم شدن قدرت ژله‌ای شدن آگار موجود در محیط کشت می‌گردد (مانتیوس و بن، ۱۹۸۵؛ پن و استادان، ۱۹۸۵).

در محیط حاوی زردچوبه با غلظت ۰/۱ درصد، بیشترین بیشترین مقدار رشد کالوس مشاهده شد (۵۲/۷۵ میلی‌گرم) که از لحاظ آماری (در سطح احتمال ۵ درصد) تفاوت معنی‌داری با مقدار رشد کالوس در محیط حاوی یک درصد اسید اسکوربیک نداشت. این نتیجه، فرضیه ما را در مورد اثر آنتی‌اکسیدانی زردچوبه بر روی مواد فنلی اثبات نمود. مقدار کمی از زردچوبه اثری برابر با غلظت ۱۰ برابر آن اسید اسکوربیک آن نشان داد. این مسأله وجود موادی با قدرت آنتی‌اکسیدانی قوی را در این ماده نشان می‌دهد. در صورتی که غلظت زردچوبه در محیط کشت افزایش یابد رشد کالوس کاهش یافته است که البته از یک روند خاص پیروی نمی‌کند و احتمالاً کاهش در رشد کالوس مربوط به اثر فشار اسمزی بر جذب مواد

غذایی از محیط کشت می‌باشد. زیرا زردچوبه مانند یک ماده خارجی عمل کرده، غلظت محیط کشت و به تبع آن فشار اسمزی را بالا می‌برد. (احسان پور و امینی، ۲۰۰۱). در مورد اثر فشار اسمزی بر روی رشد ریزنمونه، کیانی فریز و همکاران (۲۰۰۵) آزمایشی را بر روی ریزنمونه‌های زیتون در محیط MS انجام دادند و متوجه شدند که در محیطی که حاوی یک دوم عناصر پرمصرف می‌باشد، قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌ها کمتر دیده شده و رشد آن‌ها افزایش می‌یابد و علت آن را این‌طور عنوان نمودند که هرچه غلظت نمک‌ها در محیط کشت کمتر باشد، به‌علت کاهش پتانسیل اسمزی محیط کشت، امکان جذب آب و مواد غذایی بیشتری برای ریزنمونه‌ها فراهم می‌شود. جذب آب، حفظ حالت آماس سلول‌ها را ممکن می‌سازد و از این طریق به رشد آن‌ها کمک می‌کند. از طرفی غلظت بالای نمک‌ها باعث تولید بیشتر ترکیبات فنلی و در نتیجه افزایش قهوه‌ای شدن می‌گردد (کیانی فریز و همکاران، ۲۰۰۵). زردچوبه نیز به‌علت دارا بودن مواد مختلف از جمله نمک‌های سدیم (آرجو و لیون، ۲۰۰۱)، در غلظت‌های بالاتر باعث افزایش فشار اسمزی می‌گردد، به‌طوری‌که جذب مواد غذایی را دچار اشکال نموده و رشد کالوس‌ها را کاهش می‌دهد و همچنین از اثر آنتی‌اکسیدانی آن بر روی رشد کالوس کاسته می‌شود. افزایش رشد در محیط حاوی ۱ درصد زردچوبه در مقایسه با غلظت ۰/۵ درصد، شاید به‌دلیل حضور مقدار بیشتر مواد آنتی‌اکسیدانی باشد که تا حدودی اثر فشار اسمزی را از بین برده است، البته باید در نظر داشت که اختلاف بین این دو تیمار معنی‌دار نمی‌باشد. همان‌طور که بیان شد علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی زردچوبه کورکومین و مشتقات آن می‌باشند. این مواد در غلظت ۰/۰۸ میلی‌مول، هموگلوبین را از اکسیداسیون حفظ می‌کنند (آرجو و لیون، ۲۰۰۱). پولاردی و لاکش طی بررسی‌های خود متوجه شدند که اثر کورکومین ممانعت از پراکسیداز لیپیدها است که به‌دلیل حفظ فعالیت آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در سطح بالا می‌باشد (پولاردی و لاکش، ۱۹۹۲). از طرفی با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن در ممانعت از اکسیداسیون نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. به همین دلیل می‌توان پیش‌بینی نمود که استفاده از زردچوبه در محیط کشت دارای مواد فنولی و یا محیطی که در آن فعالیت اکسیداسیونی زیاد صورت می‌گیرد، باعث کاهش این فرآیند می‌گردد (آرجو و لیون، ۲۰۰۱) و باز به همین علت در این بررسی باعث افزایش رشد کالوس‌های قهوه‌ای رنگ گردید.

با توجه به استفاده از پودر زردچوبه به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدانت، برای اولین بار در محیط کشت بافت، این تحقیق می‌تواند نقطه شروعی برای ایجاد انگیزه‌های جدید برای استفاده از مواد طبیعی جهت کاهش مشکلات ناشی از فنله شدن کشت‌ها باشد.

در نهایت می‌توان گفت که استفاده از زردچوبه در غلظت مناسب، برای اولین بار به‌عنوان ماده‌ای با قابلیت دسترسی آسان‌تر و ارزان‌تر، که دارای خواص آنتی‌اکسیدانتهی نیز می‌باشد، برای رفع مشکل قهوه‌ای شدن در کشت بافت سودمند واقع گردید. با تحقیقات بیشتر در زمینه چگونگی استفاده از این ماده، مقدار مناسب برای تأثیر بیشتر آن و انجام آزمایش‌هایی برای پی بردن به اثرات جانبی این ماده بر محیط کشت و رشد ریزنمونه یا کالوس، می‌توان به رهیافت‌های جدیدی در زمینه استفاده از مواد طبیعی در محیط کشت بافت دست پیدا کرد و گامی در راه هرچه آسان‌تر کردن این تکنیک، جهت ازدیاد گیاهان برداشت.

### منابع

1. Altman, A. 1982. Polyamines and wounded storage tissue: Inhibition of RNase activity and solute leakage. *Physiol Plant*. 54: 194-198.
2. Ammon, H., and Wahl, M. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*. 57: 1-7.
3. Ammon, H., Anazodo, M., Safayhi, H., Dhawan, B., and Srimal, R. 1992. Curcumin: apotent inhibitor of Leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). *Planta Med*. 58: 26.
4. Araujo, C., and Leon, L. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. Rio de Janeiro, Vol. 96: 5. 723-728.
5. Bagheri, M., Ziaratnia, M., and Hosseini, M. 2004. In vitro Culture of Trees. Ferdowsi Univ. Press, 245p. (Translated in Persian)
6. Bhatt, D., and Dhar, U. 2004. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch.-Ham. Ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *African Journal of Biotechnology*, 3: 10. 534-540.
7. Bonga, J.M. 1981. Organogenesis in vitro of tissues from mature conifers. In: *Vitro*, 17: 511-518.
8. Chuang, S., Chen, A., Lin, J., and Kuo, M. 2000. Inhibition by cucurmin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. *Fd Chem Toxicol*. 38: 991-995.
9. Cornel, D., Grignon, C., Rona, J., and Heller, R. 1983. Measurement of intracellular potassium activity in protoplasts of *Acer pseudoplatanus*: Orgin of their electroposivity. *Physiol Plant*. 57: 203-209.
10. Ehsanpour, A., and Amini, F. 2001. Plant cell and tissue culture. JDM Press, 181p.
11. Eigner, D., and Schols, D. 1999. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *J. Ethnopharmacol*. 67: 1-6.
12. Elmore, H., Samples, B., Sharma, S., and Harrison, M. 1990. Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 20: 131-135.
13. Govindarajan, V. 1980. Turmeric-chemistry, technology and quality. *CRC Cr Rev In Fd Sci. Nut no.??*: Pp: 199-301.

14. Hohtola, A. 1988. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature scots pine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 15: 211-222.
15. 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 & Development Biology-Plant.* 38: 4. 358-365.
16. Kiani Feriz, M., Zamani, Z., and Ebadi, A. 2005. In vitro establishment of three olive cultivars (*Olea europaea L.*). *Gorgan, J. Agri. Sci. & Natur. Resour.* 12: 4. 29-37. (In Persian)
17. Lindfors, A., Kuusela, H., Hohtola, A., and Kupila-Ahvenniemi, S. 1990. Molecular correlates of tissue browning and deterioration in Scots pine calli. *Biol Plant.* 32: 171-180.
18. Mamaghani, M., and Mashayekhi, K. 2007. Investigation effects of plant growth regulation and coconut milk on callus producing and growth of elm (*Ulmus parvifolia Jasq.*). Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, (not polished).
19. Marks, T., and Simpson, S. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *J. Hortic. Sci.* 65: 103-111.
20. Monteuis, O., and Bon, M.C. 1985. Microbuturage dusequoia geant. *Ann Rech Sylvicoles, AFOCEL*, Pp: 49-87.
21. Pan, M.J., and Staden, J.V. 1999. Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *J. Plant Growth Regulation*, 29: 3. 135-141.
22. Pulla Reddy, A., and Lokesh, B. 1992. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem.* 111: 117-124.
23. Roughley, P., and Whiting, D. 1973. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *J. Chem. Soc.* 20: 2379-2388.
24. Scartezzini, P., and Speroni, E. 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J. Ethnopharmacol.* 71: 23-43.
25. Soltani, A. 1998. Application of in Statistical Analysis (for fields in agriculture). JDM Press, 166p. (In Persian)
26. Son, S., and Hall, R. 1990. Multiple shoot regeneration from root organ cultures of *Populus alba* × *P. grandidentata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 20: 53-57.
27. Tisserat, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) in vitro. *J. Exp Bot.* 30: 1275-1283.
28. Unnikrishnan, M., and Rao, M. 1995. Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. *Pharmazie.* 50: 490-492.
29. Vaughn, K.C., and Duke, S. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol Plant.* 60: 106-112.
30. Vieitez, A., Ballester, A., Vieitez, M., and Vieitez, E. 1983. In vitro plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hortic. Sci.* 58: 457-463.
31. Weatherhead, M., Burdon, J., and Henshaw, G. 1979. Effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media: Part 2. *Z Pflanzenphysiol.* 94: 399-405.
32. Zied, A., and Tisserat, B. 1983. Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissue of date palm. *Bot Mag Toyo.* 96: 67-73.



Gorgan University of Agricultural  
Sciences and Natural Resources

*J. of Plant Production*, Vol. 16(2), 2009  
[www.gau.ac.ir/journals](http://www.gau.ac.ir/journals)

## **Investigation of antioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of *Ulmus pavarifolia* Jasq. Callus.**

**F. Vahdatpour<sup>1</sup>, \*K. Mashayekhi<sup>2</sup> and M. Piri Zirkuhi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Former M.Sc. student, Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, <sup>2</sup>Associate Prof., Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

### **Abstract**

Turmeric (*cucurma longa*) has been used as an antioxidant agent in medical as well as health sciences some years ago. However, it has not been applied in tissue culture till now. Browning tissues is result of tissue damages caused by polyphenoloxidase enzyme. In order to study this problem and reduce browning, explants are cultured in culture media containing antioxidants including citric acid, ascorbic acid 1,4 dithiotheritol, mercapto ethanol. In this study turmeric (*cucurma longa*) is used as an antioxidant. In order to investigate the antioxidant characteristics of turmeric, an experiment has been undertaken on elm browning callus, comprising comparison of turmeric with two standard antioxidants, active coal and ascorbic acid. Initial callus divided and sub-cultured in MS medium containing 25% coconut milk and 0.8% agar. Treatments were active coal, turmeric and ascorbic acid in concentrations of 0.1%, 0.5% and 1% respectively. Totally 9 treatments were used. Statistical analysis of data at 95% confidence level showed that increasing of callus growth was significant in treatments, containing ascorbic acid with concentration of 1% and turmeric with concentration of 0.1%. Medium containing active coal with concentrations of 0.5%, 1% and turmeric 0.5% concentration showed significant decrease of browning in comparison with other treatments.

**Keywords:** Antioxidant, Tissue culture, Turmeric, *Ulmus pavarifolia* Jasq

---

\* Corresponding Author; Email: [kambizm@yahoo.com](mailto:kambizm@yahoo.com)