دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
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[۱]، *کامبیز مشایخی[۲] و مینا پیری‌زیرکوهی[۱]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]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، پلی‌ونیل پیرولیدون، 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، ٢٠٠٤).

قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی اغلب به دنبال صدمه دیدن آن‌ها ایجاد می‌گردد و عموماً نتیجه آن نیز از بین رفتن نمونه مورد کشت می‌باشد. به‌طورکلی قهوه‌ای شدن در گیاهان به‌وسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) صورت می‌گیرد (مارکس و سیمسون، ۱۹۹۰؛ ون و دوک، ١٩٨٤). که در پلاست‌های سلول‌های گیاهی قرار دارد. پیش ماده فنولی این آنزیم در واکوئل‌های سلول‌های گیاهی ذخیره می‌شود و بدین‌وسیله حضور جداگانه این مواد در واکوئل‌ها 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 آنتی‌اکسیدانت‌هایی مانند اسید آسکوربیک، اسید سیتریک، ۱ و ٤ دی‌تیوتریتول و مرکاپتواتانول استفاده نمود (هوآنگ و همکاران، ۲۰۰۲).

ریزنمونه‌های بعضی از گونه‌های گیاهی اغلب بعد از ۵-۳ 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 (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱). غیر از عوامل آنزیمی، عوامل دیگری چون فاسد بودن آگار مورد استفاده، اتوکلاو نادرست، به‌شدت قلیایی یا اسیدی بودن محیط کشت نیز ممکن است باعث قهوه‌ای شدن نمونه‌ها در محیط‌های کشت بافت گردند (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱). فصل جداسازی نمونه و موقعیت بافت در گیاه نیز برروی این پدیده بی‌تأثیر نیست (باقری و همکاران، ۲۰۰٤). 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).

کیانی‌فریز و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی خود برروی 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، ۲۰۰٤).

۲. قهوه‌ای شدن توسط نور افزایش می‌یابد. می‌توان به‌وسیله کاغذ آلومینیومی قاعده لوله آزمایش را پوشاند (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱) و یا گیاه را قبل از برش به‌مدت 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. پلی ونیل پیرولیدون[1] (PVP) یکی از مؤثرترین آنتی‌اکسیدان‌ها است (باقری و همکاران، ۲۰۰٤). 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

1- Poly Venil Pirolidon

ریزنمونه (باقری و همکاران، ٢٠٠٤) در محلول آنتی‌اکسیدان به‌مدت 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، ١و٤- دی‌تیوتریتول، گلوتاتیون و مرکاپتواتانول را افزود (احسان‌پور و امینی، ٢٠٠١). بهتر است برای استریل این مواد از فیلتراسیون (با منافذ ٠/٢٢) استفاده شود تا خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها که در اثر اتوکلاو کردن از بین می‌رود یا کاهش می‌یابد، حفظ گردد (احسان‌پور و امینی، ٢٠٠١). اسید آسکوربیک در محیط کشت بسیار ناپایدار است اما برخی از فرآورده‌های تجزیه شده آن نیز نقش آنتی‌اکسیدانی را به‌خوبی انجام می‌دهند (المور و همکاران، ١٩٩٠).

٤. خیساندن ریزنمونه در آب پس از برش (باقری و همکاران، ٢٠٠٤)، نگهداری ریزنمونه‌های نراد (*Abies balsamea*)، پیسهآ (*Picea glauca*) و شاه‌بلوط (*Castanea sativa*) به‌صورت غوطه‌ور در آب طی عمل برش (وییتز و همکاران، ١٩٨٣) و استفاده از تیمار سرمادهی در ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤-٤٨ ساعت (احسان‌پور و امینی، ٢٠٠١).

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

٦. استفاده از محیط کشت مایع که ترکیبات فنلی و تولیدات سمی را رقیق‌تر می‌کند (احسان‌پور و امینی، ٢٠٠١).

٧. جلوگیری از زخمی شدن زیاد ریزنمونه

٨. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت مثل توفوردی[1] و ایندول استیک اسید[2] که سنتز مواد فنلی را به تأخیر می‌اندازند (احسان‌پور و امینی، ٢٠٠١).

٩. پوشاندن انتهای برش ریزنمونه‌ها توسط پارافین به‌عنوان یک تکنیک جدید در کشت بافت (بات و دار، ٢٠٠٤).

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، ١٩٩٠). به‌عنوان مثال، حذف دیواره سلولی طی عمل تشکیل پروتوپلاست در گیاه افرا (*Acer pseudoplatanus*) به تراوش پتاسیم منجر شد (کورنل و همکاران، ١٩٨٣). خسارت غشای زخمی شده می‌تواند با قرار گرفتن بافت‌ها در معرض پلی‌آمین‌ها کاهش یابد (آلتمن، ١٩٨٢). قهوه‌ای شدن بافت‌ها متابولیسم آن‌ها را به‌صورت‌های مختلف

1- 2,4-D
2- IAA

تحت‌تأثیر 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 استادن، 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، هپاتیت، 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 (روگلی 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 جهش شناسایی شده است. از مشتقات زردچوبه می‌توان به کورکومین[1] (دارای خاصیت بیولوژیک ضدویروس ایدز، ضدباکتری، آنتی‌تومور و آنتی‌اکسیدانت)، آر تورمرن[2] (برای رفع مارگزیدگی)، متیل کورکومین[3] (آنتی‌باکتریال)، دی متوکسی کورکومین[4] (آنتی‌اکسیدانت)، بیس دی‌متوکسی کورکوما[5] (آنتی‌اکسیدانت) و سدیم کورمینات[6] (ضدالتهاب) اشاره نمود (اسکارتزینی و اسپرونی، ۲۰۰۰).

آنی‌کریشنان و رآوو (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[7] حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به‌دست آمده بودند. کالوس‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱٦ 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 شیره 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 ٤ تکرار و در نهایت ۳٦ 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 به‌دلیل عدم پایداری آن به دمای بالا، بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت، زیر هود و زمانی‌که 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 به‌مدت 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 برروی کالوس‌های نارون در آزمایشگاه، به‌صورت آزمایش‌های مشابه و جداگانه، دو بار انجام شد و مشاهدات مشابهی به‌دست آمد.

کالوس‌ها به‌مدت ۲ ماه در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. پس از طی این مدت کالوس‌ها را وزن کرده و وزن ثانویه به‌دست 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.

تیمار	غلظت و ترکیب محیط کشت
۱	۰/۱ درصد زغال فعال
۲	۰/۵ درصد زغال فعال
۳	۱ درصد زغال فعال
٤	۰/۱ درصد زردچوبه
۵	۰/۵ درصد زردچوبه
٦	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 برروی وزن کالوس‌ها، دارای اثر معنی‌دار است (جدول ٢). هم‌چنین مقایسه میانگین ضریب تغییرات داده‌ها نیز نشان داد که بالاترین میزان افزایش وزن کالوس مربوط به تیمارهای حاوی اسید آسکوربیک با غلظت ١ درصد و زردچوبه با غلظت ٠/١ درصد می‌باشد (جدول ٣). تیمارهای ذکر شده اختلاف معنی‌داری را در سطح ٥ درصد، نسبت به تیمارهای زغال فعال با غلظت ٠/٥ و ١ درصد و زردچوبه با غلظت ٠/٥ 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 ٠/١ 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، به‌طوری‌که افزایش رشد کالوس در غلظت ١ درصد به بیشترین حد خود رسید، اگرچه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین سه سطح اسید آسکوربیک دیده نمی‌شود (جدول ٣).

جدول ٢- نتایج تجزیه واریانس مربوط به مقدار کالوس تولیدی در محیط‌های مختلف.

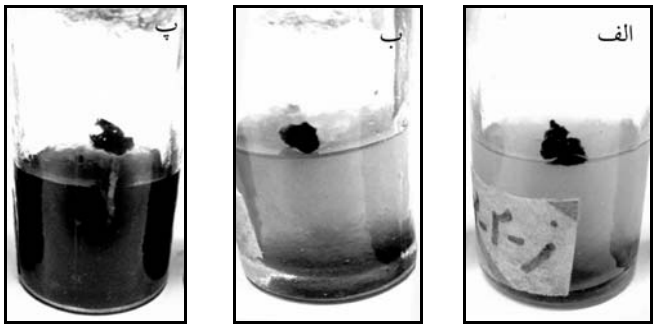
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات رشد کالوس
تیمار	٨	٣٩٣/٣١٩*
خطا	٢٤	١٣٠/١٩٩

کاربرد زردچوبه در غلظت ٠/١ درصد از نظر افزایش رشد کالوس، اختلاف معنی‌داری با غلظت ٠/٥ نشان داد، هر چند که با غلظت ١ درصد، در سطح آماری ٥ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد (جدول ٣). در مورد زغال فعال نیز اختلاف معنی‌داری بین سه سطح به‌کار رفته وجود ندارد. هم‌چنین اکثر تیمارها از نظر آماری در یک سطح بوده و کمترین میزان افزایش وزن مربوط به تیمارهای ٠/٥ و ١ درصد زغال فعال و تیمار ٠/٥ درصد زردچوبه می‌باشد (جدول ١).

جدول ۳- مقایسه میانگین رشد کالوس در تیمارهای مختلف.

تیمار	میانگین وزن کالوس تولیدی هر تیمار (میلی‌گرم)	ضریب تغییرات
۰/۱ درصد زغال فعال	٤٨[ab]	
۰/۵ درصد زغال فعال	۳۲/۵[bc]	
۱ درصد زغال فعال	۳۲/۰۰[bc]	
۰/۱ درصد زردچوبه	۵۲/۷۵[a]	
۰/۵ درصد زردچوبه	۲٦/۰۰[c]	۲۸/۷
۱ درصد زردچوبه	۳۷/۰۰[abc]	
۰/۱ درصد اسید آسکوربیک	۳۷/۰۰[abc]	
۰/۵ درصد اسید آسکوربیک	٤۱/۰۰[abc]	
۱ درصد اسید آسکوربیک	۵۵/۰۰[a]	
CV	۲۸/۷	

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



شکل ۱- عکس‌برداری بعد از ٤ 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 به‌شدت باعث قهوه‌ای شدن می‌گردد که با استفاده از اسید آسکوربیک از بروز این مسأله به‌میزان زیادی ممانعت به عمل آمد و با نتایج بررسی حاضر در مورد اسید آسکوربیک مطابقت داشت، به این صورت که در محیط دارای اسید آسکوربیک 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 به‌علت کم شدن قدرت آنتی‌اکسیدانتی اسید آسکوربیک این فرایند متوقف گردید (هوآنگ و همکاران، ۲۰۰۲). المور و همکاران (۲۰۰٤) نیز از اسید آسکوربیک به‌عنوان 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 به‌دلیل 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 علاوه‌بر محصولات اکسیداسیونی فنلی باعث جذب بعضی از ترکیبات مانند تنظیم‌کننده‌های رشد که برای رشد ضروری می‌باشند نیز می‌گردد که نکته‌ای منفی برای آن به‌شمار 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 استادن، 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 آسکوربیک نداشت. این نتیجه، فرضیه ما را در مورد اثر آنتی‌اکسیدانی زردچوبه برروی مواد فنلی اثبات نمود. مقدار کمی از زردچوبه اثری برابر با غلظت ۱۰ برابر آن اسید آسکوربیک آن نشان داد. این مسأله وجود موادی با قدرت آنتی‌اکسیدانی قوی را در این ماده نشان می‌دهد. در صورتی‌که 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. (احسان‌پور و امینی، ۲۰۰۱). در مورد اثر فشار اسمزی برروی رشد ریزنمونه، کیانی‌فریز و همکاران (۲۰۰۵) آزمایشی را برروی 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 (کیانی‌فریز 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 برروی 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 گلوتاتیون 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 فرایند 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 آنتی‌اکسیدانتی 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 poplished).
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.Monteuuis, 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. Ethnoparmacol. 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

Investigation of ontioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of *Ulmas pavrifolia* Jasq. Callus.

F. Vahdatpour[1], *K. Mashayekhi[2] and M. Piri Zirkuhi[1]

[1]Former M.Sc. student, Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]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 antixidantal 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 pavrifolia* Jasq

* Corresponding Author; Email: kambizm@yahoo.com