DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی

کاربرد زغال فعال و نانولوله‌های کربنی در حذف مواد فنولی از محیط کشت بافت گیاهان انگور و پالونیا

محمد زارعی، مهدی علیزاده*، سارا خراسانی نژاد و مصطفی خوشحال سرمست

ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۲۷ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۱۴

چکیده

عوامل متعددی در ریزازفزایی گیاهان در شرایط درون‌شیشه محدودیت ایجاد می‌کنند. قهوه‌ای شدن یک مشکل جدی در استقرار ریزنمونه‌ها در گیاهان چند ساله چوبی است و انجام موفقیت‌آمیز تکنیک‌های درون‌شیشه‌ای را پیچیده می‌سازد. در جهت حل این مشکل، کاربرد منابع زغال (جاذب فنول)، با هدف کنترل عوامل موثر بر قهوه‌ای شدن محیط کشت بافت صورت گرفت تا غلظت ترکیبات فنولی کاهش یافته و راهکاری برای حل مسئله قهوه‌ای شدن اکسیداتیو در ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای پالونیا و انگور دنبال شود. پژوهش حاضر در آزمایشگاه گروه باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. محیط پایه MS حاوی IBA (به ترتیب ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر برای انگور و پالونیا)، در محیط تکثیر با غلظت‌های مختلف زغال فعال و نانولوله کربن (۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰ میلی‌گرم بر لیتر)، در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. میزان ترکیبات فنولی کل محیط کشت بافت با روش رنگ‌سنجی فولین-سیکالتیو و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که هر دو فرم زغال فعال و نانولوله کربن بر میزان جذب فنول محیط کشت و پرآوری ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای اثرات مثبت و معنی‌دار داشت. نتایج این مطالعه نشان دهنده آن است که می‌توان از تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن به عنوان منابع کربن جذب کننده فنول در محیط‌های کشت این گیاهان استفاده کرد. نتایج این پژوهش با اندکی تغییر در سایر گیاهان و ریزافزایی تجاری قابل استفاده خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: فنول، قهوه‌ای شدن، زغال فعال، نانو لوله کربن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۲۴۲۳۳۰۳ ، پست الکترونیکی: mahdializadeh@gau.ac.ir

مقدمه

از دیدگاه تجاری کشت انگور، پیوندزنی بر روی یک پایه مناسب، روش مورد استفاده در تاکستان‌های استاندارد در بیشتر مناطق جهان است. اکثر تاکستان‌های تجاری در حال حاضر از کاشت مستقیم انواع انگور به دلیل حساسیت ارقام کشت شده به آفات به عنوان مثال، میکروب‌ها، کنه‌ها، حشرات، نماتدها و مهم‌تر از همه فیلوکسرا که منجر به زوال و مرگ نهال می‌شود، اجتناب می‌نمایند. برای کشت استاندارد در تاکستان‌های تجاری، تمرکز بیشتر بر روی کلون‌های یکسان به تعداد زیاد است. از این رو ریزازدیادی گزینه مهمی برای روش‌های متداول تکثیر گیاه است. در واقع، تقاضا برای مواد گیاهی جهت کشت نشان می‌دهد که ازدیاد زیاد در سطح کم برای تکثیر انبوه در محصولات مختلف باغی ضروری است. علاوه بر تولید پایه‌های یکنواخت در مدت زمان کوتاه و خارج از فصل رشد گیاهان، این روش همچنین در بین روش‌های مبتنی بر کشت بافت مانند جهش، غربالگری آزمایشگاهی، مهندسی ژنتیک و تبادل ژرم پلاسم، دارای ارزش است (۳، ۵).

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی

از مشکلات مهم مهندسی ژنتیک و تبادل ژرم‌پلاسم تراوش فنول از بافت گیاهی در محیط کشت می‌باشد (۳، ۲۶). بنابراین خنثی‌سازی و حذف فنول‌های آزاد شده در محیط کشت اولین اقدام ضروری در کشت بافت محسوب می‌شود (۳). همچنین پروتکل‌هایی برای تکثیر انگور گزارش شده است (۲۰، ۳۸، ۴۱، ۴۴، ۳۲). استفاده از تکنیک‌های درون‌شیشه‌ای برای تکثیر ارقام مختلف انگور به خوبی اثبات شده است (۳، ۶، ۲۴، ۳۶، ۳۷). امروزه با توجه به، مطالعات گسترده در حوزه نانو مواد در سایر بخش‌ها و قرار گرفتن آن به عنوان علم روز (۱۶، ۳۰)، ارزیابی استفاده این مواد در زمینه کشت بافت گیاهی و علوم وابسته به آن و بهینه‌سازی غلظت مناسب زغال در محیط کشت احساس می‌شود. همچنین نیاز به چوب با ارزش در مبلمان، سازه‌های موسیقی، و محصولات دیگر چوبی باعث شده در سال‌های اخیر استفاده از پالونیا مورد توجه قرار گیرد. پالونیا درختی سریع الرشد با چوب سبک وزن است (۴۶)، که چوب آن در بازارهای جهانی محبوبیت بالایی دارد (۱۰). تقاضای زیاد برای کاشت مواد گیاهی در بازارهای داخلی و بین المللی برای جلوگیری از جنگل‌زدایی و تولید انرژی زیستی نیاز به ایجاد پروتکل‌های ریزازدیادی کارآمد برای تکثیر سریع و گسترده پالونیا را دارد.

کشت بافت گیاهی کشت ضدعفونی شده سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها و اجزای آنها در شرایط فیزیکی و شیمیایی در شرایط درون شیشه‌ای تعریف شده است (۱۳). منشأ این تکنیک در ابتدای قرن بیستم توسط دانشمند آلمانی به نام «هابرلنت» که در نامه خود به آکادمی علوم آلمان در سال ۱۹۰۲ در آزمایش‌های خود بر روی تک سلول ابداع شد. مطالعات اولیه منجر به کشت ریشه‌ها، کشت جنین و اولین کالوس در کشت بافت شد (۴۳). کشت بافت گیاهی همچنین به عنوان کشت سلول ضدعفونی شده (شرایط درون‌شیشه‌ای، محیط کنترل شده و یا کشت استریل) نامیده می‌شود (۴۳). یکی از عواملی که باعث از بین رفتن ریزنمونه در کشت بافت گیاهی ایجاد مشکل می‌کند اکسیداسیون ترکیبات فنولی است که در اثر زخم بافت گیاهی و ترشح این ترکیبات از سلول ایجاد می‌شود (۲۵).

یکی از موانع موجود در کشت درون شیشه ای تراوش فنول‌ها است. آزاد شدن ترکیبات فنولی باعث قهوه‌ای شدن محیط کشت و از بین رفتن ریزنمونه می‌گردد. دلیل اصلی قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهی تجمع و اکسایش ترکیبات فنولی در بافت‌ها می‌باشد. که اغلب به عنوان پاسخ دفاعی گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنده می‌باشد (۱). غلظت و عناصر محیط‌های کشت نقش موثری در تولید این ترکیبات دارند. اکسیداسیون ترکیبات فنلی در محیط کشت موجب کاهش موفقیت در فرآیند کشت بافت و پیچیده شدن مراحل آن می‌شود (۲). برای کاهش مشکل قهوه‌ای شدن از زردچوبه، زغال فعال، اسید آسکوربیک، اسید سیتریک، و پلی وینیل پیرولیدون (pvp)، جابجایی ریزنمونه و نگهداری در شرایط تاریکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۲). شدت قهوه‌ای شدن با توجه به گونه بافت یا اندام، فاز رشد و نمو گیاه، سن بافت یا اندام و مواد مغذی و سایر متغیرهای کشت بافت متفاوت است (۱۵). مسیر بیوسنتز ترکیبات فنولی در منبع شماره ۲۷ شرح داده شده است.

زغال فعال ماده‌ای بی مزه نافذ و دارای سیستم بسیار مناسبی از منافذ با سطح داخلی زیاد است که باعث از بین بردن تمام ناخالصی‌های غیر کربن می‌شوند. این مواد، برای جذب ترکیبات فنولی و جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها و محیط کشت کاربرد دارد (۴۲). عوامل متعددی مانند چگالی، خلوص زغال و pH بر ظرفیت جذب زغال فعال تاثیر می‌گذارد (۱۴).

نانولوله کربن (CNTs) جنس دیواره‌اش از اتم‌های کربن است. که به دلیل خاصیت الکتریکی و مکانیکی آن طی سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۹). این روزها ذرات نانو تقریباً در کلیه محصولاتی مانند خوشبو کننده‌های اتاق، شوینده‌های لباس، محصولات بیولوژیکی و

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی

منسوجات، حذف عنصر نقره از فاضلاب مورد استفاده قرار گرفته است (۳۰). کاربرد نانو ذرات (اندازه ۱ تا ۱۰ نانومتر) در کشت بافت گیاهی، بیشتر با هدف کاهش آلودگی و حذف عوامل آلوده‌گر از محیط کشت یا نمونه-های گیاهی بوده است (۲۹). نانوذرات نقره در این مورد کاربرد گسترده‌ای داشته است. مثلا سرمست و همکاران (۳۳) گزارش کردند که نانوذرات نقره، بدون تاثیر منفی بر رشد بافت‌های گیاهی میتواند آلودگی را حذف نماید. برخی دیگر از پژوهشگران، تاثیر منفی و مثبت این موارد را در کنار نقش ضدعفونی کننده آن‌ها، بیان کرده اند (۲۹). کیم و همکاران (۲۰۱۷) در یک مقاله مروری، کاربرد نانومواد در کشت بافت گیاهی را مرور کرده اند (۱۸). طاها و همکاران (۲۰۱۶) کاربرد نانولوله کربنی را در کشت بافت گیاه خرما آزمون نموده‌اند. اگر چه در تولید جنین رویشی تاثیر منفی داشته است، ولی در مراحل تولید شاخه و باززایی آن بسیار مفید بوده است (۳۹).

در پژوهش حاضر، کاربرد منابع زغال (زغال فعال معمولی و نانولوله کربنی)، با هدف کنترل عوامل موثر بر قهوه‌ای شدن محیط کشت بافت گیاهان انگور و پالونیا مطالعه شد.

مواد و روشها

انتخاب و آماده سازی گیاهان مادری: دو گیاه انگور و پالونیا که هر دو متعلق به گروه گیاهان چوبی هستند، به هنگام کشت درون‌شیشه‌ای دارای تراوش فنول زیادی هستند. در این پژوهش، انگور رقم «قزل اوزوم» (*Vitis vinifera* cv Ghezel Uzum) و پالونیا گونه فورچونی (*Paulownia fortunei*) استفاده شد. ریزنمونه انگور از شاخه سال جاری از تاک‌های پنج ساله در تاکستان‌های اطراف استان گلستان جمع آوری شد. سالم‌ترین شاخه‌های انگور به صورت بصری جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. از بذور پالونیا تهیه شده از کلکسیون گیاهی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، برای تهیه ریزنمونه و تکثیر درون‌شیشه‌ای استفاده شد.

کشت و استقرار درون‌شیشه‌ای: شاخه‌های انگور که در سال جاری شروع به رشد کرده‌اند، فقط قسمت بالغ حدود (۳ ماهه) در خردادماه جمع‌آوری شدند و بلافاصله در نایلون پیچیده و به آزمایشگاه منتقل شدند. برگ‌ها و پیچک‌ها حذف شده و با کوتاه کردن ساقه‌ها به بخش‌های گره‌ای، ریزنمونه‌های تک‌گره آماده شدند (هر کدام حدوداً به طول ۵/۱ تا ۲ سانتیمتر حاوی یک جوانه جانبی). بخش‌هایی که در قسمت میانی شاخه قرار دارند، یعنی بالاتر از گره دوم تا سوم از پایه و زیر گره چهارم تا پنجم از قسمت نوک شاخه انتخاب شدند. این ریزنمونه‌های تک‌گره کاملاً در محلول ۴ گرم بر لیتر قارچکش کاربندازیم روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) به هم زده شدند، و سپس با آب و مایع ظرفشویی ضدعفونی شده و سپس ۴ نوبت آبکشی شد. در ادامه با آب مقطر اتوکلاو شده، شستشو صورت گرفت. این ریزنمونه‌های پیش تیمار شده، به مدت ۳۰ دقیقه تحت محلول هیپوکلریت سدیم (۴۰ ٪) قرار گرفتند. و پس از آن در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲۵ ثانیه در داخل هود لامینار قرار گرفت. پس از هر تیمار، نمونه ها حداقل در سه نوبت در آب مقطر استریل شسته شدند و در نهایت به طور انفرادی در هر شیشه کشت بر روی محیط جامد MS (موراشیگی و اسکوک، ۱۹۶۲)، حاوی NAA و BAP (به ترتیب۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. شاخه‌های درون شیشه‌ای حاصل از این نمونه‌ها بریده شده و روی محیط پایه MS حاوی IBA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند تا تعداد زیادی نمونه برای آزمایش کاربرد زغال ایجاد شود.

در مورد پالونیا نیز بذرها به دلیل ریز بودن در درون یک سرنگ پزشکی بارگذاری شدند و سپس در داخل هود لامینار سه نوبت با اتانول مطلق، هر نوبت به مدت ۴۰ ثانیه سترون شدند. بدین ترتیب که اتانول با کشیدن دسته سرنگ به داخل مخزن مکیده شد و پس از طی مدت زمان موردنظر، تخلیه شد. بلافاصله پس از تخلیه اتانول، چندین نوبت آب مقطر با سرنگ مکیده و تخلیه شد تا بذرها کاملا

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی

شسته شوند. سپس بذرهای سترون شده به صورت ۴ تایی روی محیط کشت نیم غلظت MS کشت شدند. پس از ۴ هفته، دانهال‌های تولید شده روی محیط کشت MS حاوی (۴ میلی‌گرم در لیتر IBA) قرار گرفتند و در این محیط کشت به صورت نمونه‌های دوبندی تا چندین چرخه بازکشت شدند تا تعداد کافی نمونه درون‌شیشه‌ای برای آزمایش اصلی ایجاد شود. ظروف کشت انگور و پالونیا در کل آزمایش در دمای ۲۵+۱ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت روشنایی و تاریکی (۲۷ میکرومول m-2 s-1) انکوبه شدند.

کاربرد منابع زغال: برای ارزیابی تاثیر زغال، گیاهان درون‌شیشه‌ای که در مراحل قبل تولید شده بودند به تعداد کافی انتخاب شدند. ریزنمونه‌های دوبندی ساقه از هر دو گیاه انگور و پالونیا تهیه و روی محیط کشت حاوی ۲ یا ۴ میلی‌گرم در لیتر IBA (به ترتیب برای انگور و پالونیا) حاوی هر دو فرم زغال (۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۰ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. در هر تیمار ۳ تکرار و حداقل ۱۰ ظرف کشت در هر تکرار کشت شد. در تمام محیط کشت-ها از آگار (۸ گرم بر لیتر) استفاده شد و pH قبل از اتوکلاو (۲۰ دقیقه) در ۸/۵ تنظیم شد.

اندازه‌گیری فنول محیط کشت: میزان ترکیبات فنولی کل محیط کشت بافت بر اساس روش شارما (۱۹۹۴) (۳۵)، رنگ سنجی فولین-سیکالتو و بر حسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از اتانول ٪۸۰ به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار معینی از محیط کشت، یعنی ۲۰ میلی‌لیتر برای تخمین تراوش فنول کل مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌های تک‌گره از لوله‌های کشت خارج شدند و به هر لوله، ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ ٪ اضافه شد. سپس با یک میله شیشه‌ای کاملا مخلوط شد. این لوله‌های آزمایش حاوی مخلوط بدست آمده در نیم ساعت با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه (شیکر دوار) و سپس با سانتریفوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت) انجام شد. بدین ترتیب مخلوط به دست آمده با آب مقطر و با فیلتر کاغذی واتمن شماره ۴۲ فیلتر شده و حجم نهایی بعد از فیلتر شدن به ۲۰ میلی‌لیتر توسط اتانول ۸۰ ٪رسانده شد. دو میلی‌لیتر از این عصاره برای برآورد فنول استفاده شد. به عصاره، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول (۱/۱۰ رقیق) استوک معرف Folin_ Ciocalteau اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه، ۸ میلی‌لیتر محلول ۷/۵ ٪کربنات سدیم اضافه شد. این واکنش به مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از دو ساعت، جذب رنگ در اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر انجام شد. سپس محتوای کل فنول در نمونه محاسبه شد و توسط قرار دادن داده‌های بدست آمده در منحنی استاندارد اسید گالیک میزان جذب فنول محاسبه شد.

اندازه‌گیری صفات درون‌شیشه‌ای: صفات مورفوفیزیولوژیکی مربوط به ریشه و شاخساره در دوره-های مشخصی پس از بازکشت در نمونه‌های انگور و پالونیا اندازه‌گیری شد. میزان رنگدانه‌های کلروفیل با روش بارنز و همکاران (۷) انجام شد. سطح برگ با کاغذ میلیمتری اندازه‌گیری شد. کیفیت ظاهری گیاهچه‌ها نیز به صورت امتیازدهی و طبق روش پیشنهادی علیزاده (۱۳۹۰)، برآورد شد که ۱ کمترین و ۵ بالاترین کیفیت بود (۳).

تجزیه و تحلیل: پژوهش حاضر به صورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در هر تکرار حداقل ۱۰ عدد ظرف کشت استفاده شد (تعداد کشت بیش از ۱۰ عدد ظرف بود که برخی از کشت‌ها در اثر آلودگی کنار گذاشته شد و در نهایت ۱۰ عدد ظرف که نمونه‌ها در حال رشد فعال بودند برای داده‌برداری استفاده شدند). تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین داده‌ها (در سطح آماری یک و پنج درصد) با استفاده از نرم افزار SAS نسخه‌ی ۸,۲ (۳۴) و رسم نمودارها با Excel صورت گرفت.

نتایج

تعیین نحوه رشد و پاسخ درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی

انگور و پالونیا بر روی صفات مربوط به ریشه، ساقه، کیفیت ظاهری، میزان زنده مانی و خصوصیات شیمیایی ریزنمونه بعد از ۴۰ روز انکوبه کردن معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس حاصل از تاثیر مقادیر مختلف زغال فعال بر گیاه انگور

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد برگ	تعداد شاخه	ریشه-زایی (٪)	تعداد ریشه	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)	کیفیت ظاهری	سطح برگ (mm^2)	زنده مانی (٪)
تیمار	۸	۱۲۱/۰۰**	۴/۵۶**	۳۶۳**	۸۹/۸۹**	۱۲۲/۲۸**	۱۰/۲۸*	۰/۸۵**	۱/۹۳**	۱۷۰/۱۱**
خطا	۱۸	۴/۱۸	۰/۵۹	۱	۱/۴۸	۳/۲۲	۳/۷۵	۰/۲۱	۰/۰۶	۰/۶۴

ادامه جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس حاصل از تاثیر مقادیر مختلف زغال فعال بر گیاه انگور

منابع تغییرات	کلروفیل **a** (mg/g F.W)	کلروفیل b (mg/g F.W)	کلروفیل کل (mg/g F.W)	کارتنوئید (mg/g F.W)	فنول بافت گیاهی (GA mg/g D.W)	فنل محیط کشت (GA µg/ml)
تیمار	۰/۰۱۶**	۰/۰۱۹**	۰/۰۸**	۰/۳۰**	۰/۰۰۰۴**	۰/۰۰۰۰۱**
خطا	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۰۰۵

** اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد، * اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

در بررسی اثر مقادیر زغال بر گیاه انگور، نتایج زیر بدست آمد. القای ریشه‌زایی در ریزنمونه دوبندی انگور در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربن به مدت یک هفته زودتر از سایر تیمارها رخ داد. رشد شاخساره در ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر زغال فعال ۶ روز بعد از انجام تیمارها نسبت به سایر غلظت‌ها سریعتر مشاهده شد. همچنین شروع بازشدن جوانه در تک‌گره انگور در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال (نه روز بعد از انکوبه کردن) سریعتر از سایر تیمارها مشاهده شد.

بیشترین تعداد برگ در ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر زغال فعال بیشتر از سایر غلظت‌ها بود، و صرف‌نظر از ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر زغال فعال با افزایش غلظت زغال فعال محیط کشت، تعداد برگ تولید شده در گیاهچه‌های انگور افزایش پیدا کرد (شکل ۱). غلظت‌های مختلف زغال بر پرآوری شاخه اثر مثبتی نداشت (شکل ۱). با توجه به سهل ریشه زایی انگور صرف نظر از بالاترین غلظت نانولوله‌های کربن ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های انگور به طور کامل صورت گرفت (شکل ۱).

اثر متفاوت فرم زغال بر محل القا ریشه در انگور و پالونیا به صورت بصری، مشاهده شد به طوری که در هر دو گیاه انگور و پالونیا به طور یکسان در مجاور غلظت‌های نانولوله کربن جهت تشکیل ریشه، ابتدا کالوس و سپس از کالوس حاصله باززایی ریشه صورت گرفت. که با توجه به غلظت‌های متفاوت، تشکیل کالوس در ابعاد متفاوت مشاهده شد. ولی در رابطه با غلظت‌های مختلف زغال فعال تشکیل کالوس در محل ظاهر شدن ریشه مشاهده نشد (شکل ۲). که این موضوع به تنهایی نیاز به بحث و بررسی مفصل در مورد بروز چنین رویداد و یافتن اثرات فیزیولوژیکی و ژنتیکی دخیل در پدید آمدن این چنین تفاوتهایی دارد.

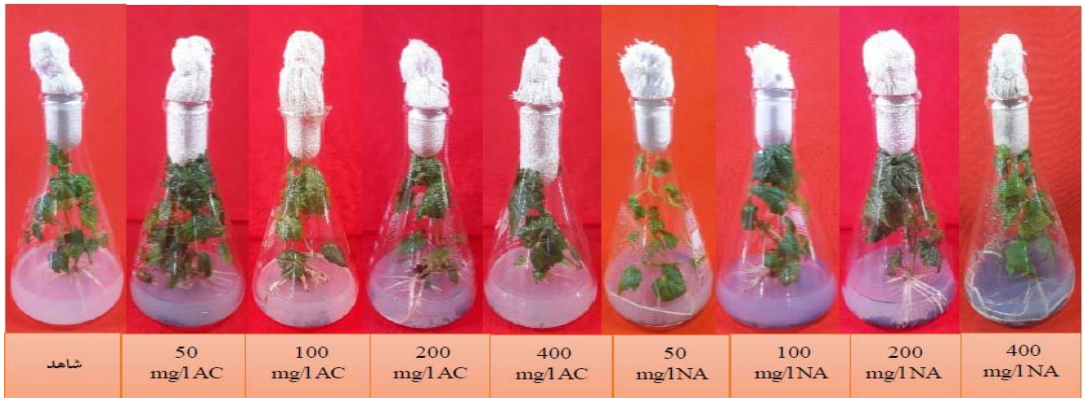
بیشترین تعداد ریشه در ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربن مشاهده شد. در حالی که غلظت‌های بالای زغال فعال بر تعداد ریشه اثر منفی داشته است (شکل ۱). غلظت بالای زغال فعال باعث افزایش طول ریشه در گیاه انگور شد که در نانولوله کربن افزایش طول ریشه مشاهده نشد (شکل ۱). بلندترین طول ساقه در ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5

کربنی (۲۶/۱۱ سانتی‌متر) مشاهده شد. افزایش هر دو نوع زغال در محیط کشت، باعث افزایش طول ساقه گیاه انگور شد (شکل ۱). مقادیر مختلف زغال، اثرات مثبت بر کیفیت ظاهری ریزنمونه انگور داشت. که از نظر مورفولوژی بالاترین شادابی و سرحالی ریزنمونه درون‌شیشه‌ای در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربنی مشاهده شد (شکل ۱). که این نتایج نشان دهنده اثر مثبت زغال بر رشد و شادابی ریزنمونه در شرایط درون‌شیشه‌ای است. این شادابی باعث تقویت گیاهچه شده که در مراحل سازگاری و انتقال به خاک بسیار مفید است. شکل ۳، مقادیر مختلف زغال در محیط کشت و میزان رشد و کیفیت ظاهری ریزنمونه درون شیشه‌ای را نشان می‌دهد.

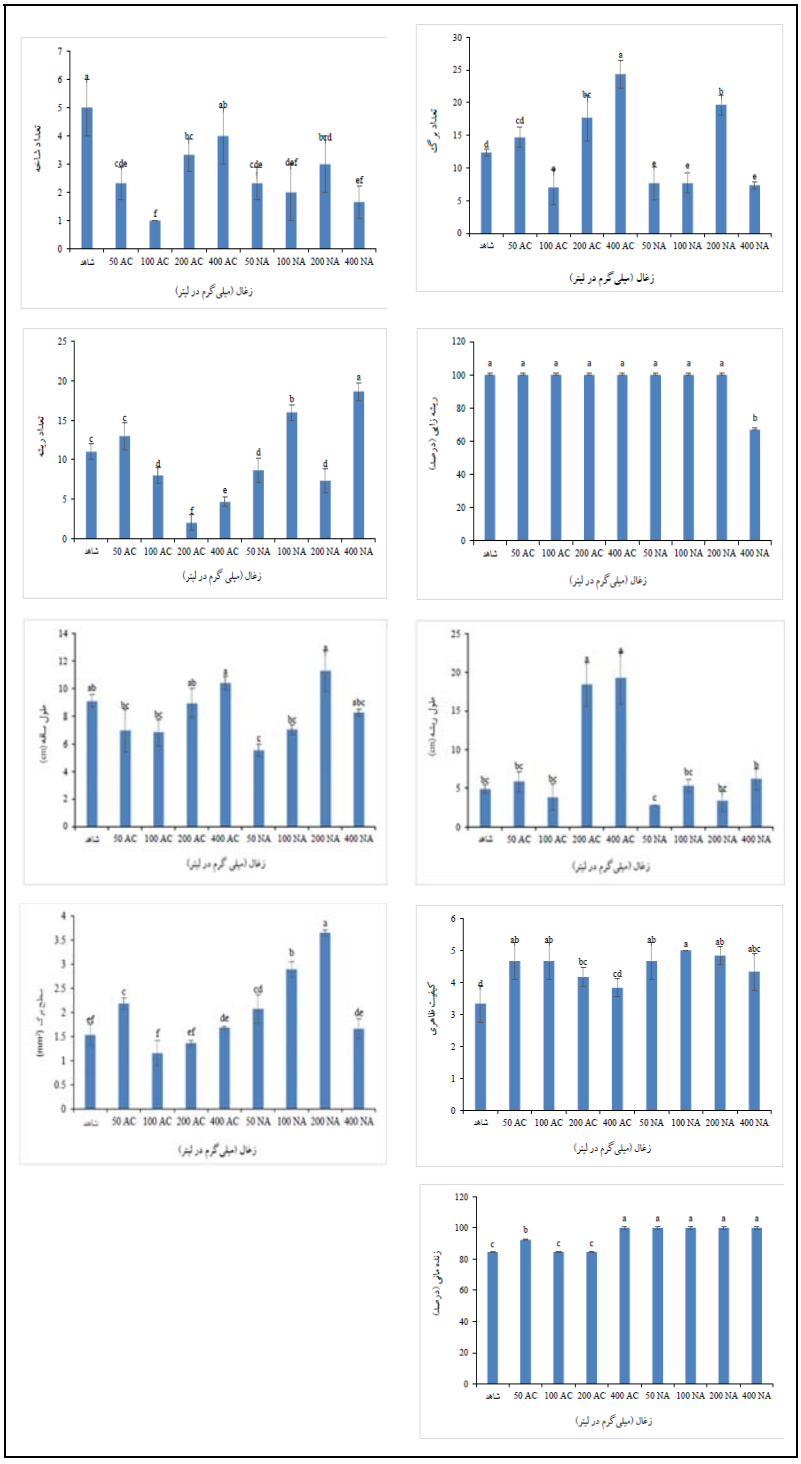
روند مشخصی از اثر زغال بر سطح برگ مشاهده نشد. بیشترین سطح برگ در ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربنی مشاهده شد (شکل ۱). میزان زنده‌مانی (در مرحله پرآوری) گیاه انگور در تمام سطوح نانولوله کربن ۱۰۰ درصد بود. همچنین در غلظت بالای زغال فعال میزان زنده‌مانی کامل بود، در حالی که در غلظت‌های پایین زغال فعال در اثر تراوش فنول از ریزنمونه و قهوه‌ای‌شدن محیط کشت، درصد زنده‌مانی کمتر بود (شکل ۱). که می‌توان این اثر مثبت نانو لوله کربن حتی در غلظت پایین در محیط کشت گیاه را مورد توجه قرار داد.

صفات شیمیایی: طبق نتایج مقایسه میانگین، در مورد اثر غلظت‌های مختلف زغال بر میزان کلروفیل، روند مشخصی مشاهده نشد. به هرحال در نمونه‌های رشد یافته در ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربنی، بیشترین میزان کلروفیل a حاصل شد. جالب توجه است که این موضوع با نتایج حاصل از کیفیت ظاهری هم‌خوانی دارد، که نشان دهنده اثر مثبت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربن بر کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید و کیفیت ظاهری گیاه انگور بود. صرف‌نظر از ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله، میزان کلروفیل b نیز مشابه کلروفیل a، اثر افزایشی در غلظت‌های مختلف زغال نشان نداد. در واقع میزان کم کلروفیل a و b می‌تواند به حساس بودن کلروفیل در شرایط درون شیشه‌ای (پدیده شیشه‌ای شدن) یا عدم نیاز گیاه به فتوسنتز، که تمام مواد غذایی در محیط کشت فراهم است، مرتبط باشد. حساسیت در شرایط درون شیشه‌ای با برون‌شیشه‌ای (محیطی) تفاوت زیادی در کارکرد و عملکرد اندام‌های گیاهی دارند. ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربن بیشترین تاثیر گذاری بر خصوصیات شیمیایی ریزنمونه درون‌شیشه‌ای انگور داشت، به طوری که افزایش میزان کارتنوئید گیاه نیز در این غلظت بالاترین حد را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳- اثرات مقادیر مختلف زغال بر رشد درون شیشه ای گیاه انگور. AC: زغال فعال، NA: نانولوله کربن

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5

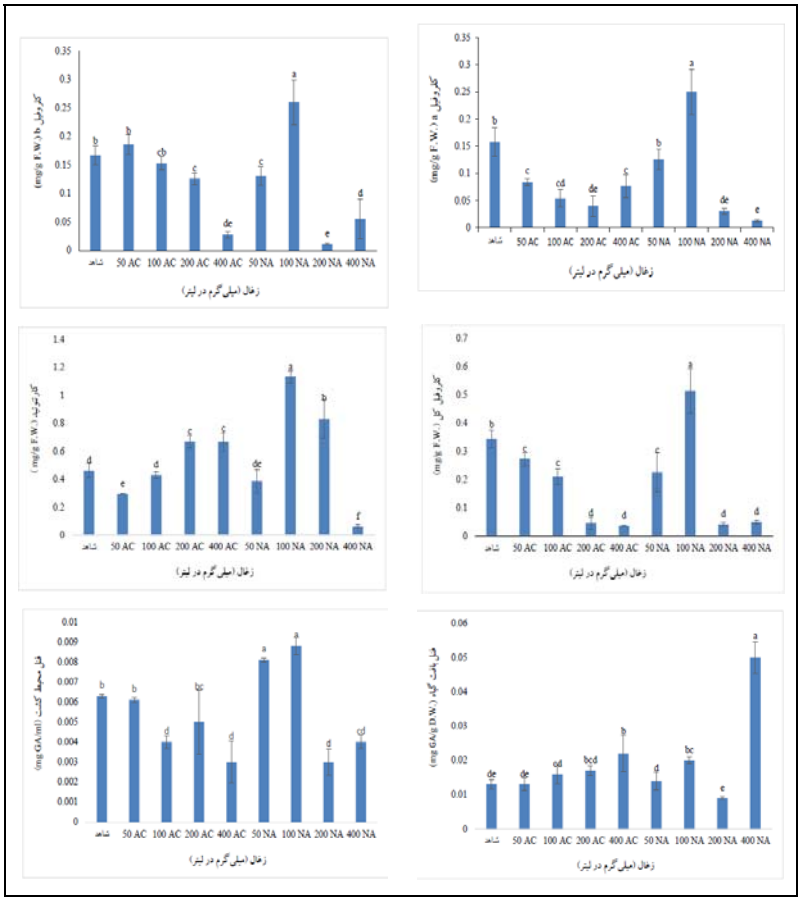


شکل ۳- اثرات مقادیر مختلف زغال بر صفات مورفولوژی گیاهان درون‌شیشه‌ای انگور. AC: زغال فعال، NA: نانولوله کربن

ارزیابی فنول محیط کشت: بعد از کشت تک گره انگور بر روی محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف زغال، میزان ترشح فنول محیط کشت بافت در طی یک دوره سه هفته‌ای، به طور متوالی در حجم‌های ۲۰ میلی‌لیتری محیط کشت اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد، که اندازه‌گیری فنول در

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی

طول سه هفته متوالی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین میزان فنول در هفته اول و سوم با ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربن مشاهده شد، که در هفته دوم بیشترین میزان فنول محیط کشت در ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال مشاهده شد. غلظت‌های مختلف زغال فعال در هفته سوم کاهش میزان فنول محیط کشت را نسبت به هفته اول نشان داد، که در رابطه با لوله کربن این موضوع برعکس بود (شکل ۵).



شکل ۴- اثرات مقادیر مختلف زغال بر صفات شیمیایی گیاهان درون‌شیشه‌ای انگور. AC: زغال فعال، NA: نانولوله کربن

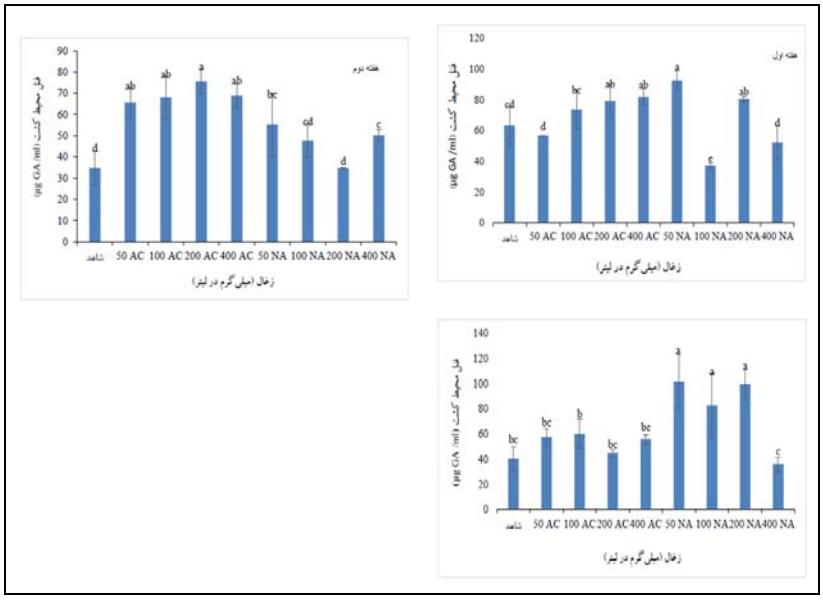
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس حاصل از تاثیر مقادیر مختلف زغال بر میزان فنول کل ارزیابی شده در محیط کشت انگور

منابع تغییرات	درجه آزادی	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
تیمار	۸	۹۱۲/۱۹**	۶۷۸/۲۹**	۱۸۲۴/۳۰**
خطا	۱۸	۷۰/۱۲	۶۴/۰۴	۱۷۴/۲۸

** اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد، * اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

صفات رشدی نمونه‌های پالونیا: با توجه به اثرات مثبت هر دو فرم زغال در نمونه‌های انگور و بررسی اثر آنها در نمونه‌های پالونیا، نتایج امیدوار کننده بیشتری در جهت کاربرد این مواد بر دیگر گیاهان چوبی، نشان داد. نتایج تجزیه واریانس صفات درون‌شیشه‌ای پالونیا سطوح معنی-داری مختلفی را نشان داد (جدول ۳). که میزان تعداد برگ در گیاه پالونیا در مجاور با سایر غلظت‌های زغال افزایش چشم‌گیری نشان داد. بیشترین و کمترین تعداد برگ به ترتیب در ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال و شاهد مشاهده شد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی



شکل ۵- اثرات مقادیر مختلف زغال بر میزان فنول محیط کشت بافت گیاه انگور. AC: زغال فعال، NA: نانولوله کربن

حداقل تعداد ریشه در ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن و حداکثر در ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربنی مشاهده شد. در غلظت‌های کم نانولوله کربن، تعداد ریشه بیشتری مشاهده شد. در بالاترین غلظت نانولوله کربن، کمترین درصد ریشه‌زایی ثبت شد (شکل ۶). طول ریشه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو کربن بیشترین میزان بود. طول ساقه حداکثر میزان رشد را در ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال داشت. بر طبق شکل (۷) کیفت ظاهری در بین غلظت‌های مختلف زغال اثر یکسان و مثبتی را نشان داد. همچنین افزایش سطح برگ در مقادیر نانولوله بالاترین حد نسبت به زغال فعال بود (شکل ۶).

بحث

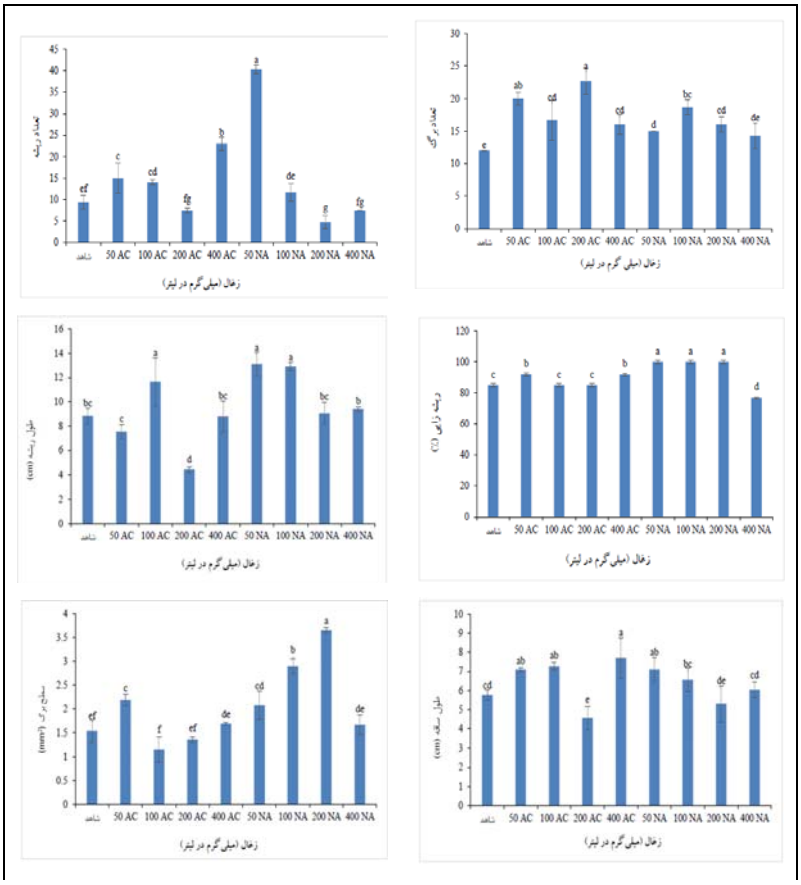
در بخش اول این پژوهش، نتایج مثبت و قابل قبولی از کاربرد زغال در باززایی شاخساره، ریشه و کیفیت ظاهری انگور مشاده شد، که باعث شد مطالعه وسیع‌تر آن بر روی گیاه پالونیا نیز بررسی شود. تکثیر و پرآوری در شرایط درون شیشه‌ای بر روی دو گیاه انگور و پالونیا، سطوح مختلفی از موفقیت را در مطالعه حاضر نشان داد که با مطالعات فیگیرودو و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت داشت (۱۱).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف زغال بر پارامترهای رشد درون شیشه‌ای گیاه پالونیا

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد برگ	تعداد شاخه	تعداد ریشه	ریشه‌زایی (٪)	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)	کیفیت ظاهری	سطح برگ (mm^2)
تیمار	۸	۳۰/۶۷**	۰/۳۳ns	۳۶۵/۱۴**	۲۰۸/۶۴**	۲۲/۳۰**	۳/۲۰**	۰/۳۴ns	۱/۹۱**
خطا	۱۸	۲/۵۹	۰/۱۸	۲/۷۷	۰/۸۵	۰/۹۴	۰/۳۸	۰/۱۷	۰/۰۶

**اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد، * اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5



شکل ۶- اثرات مقادیر مختلف زغال بر صفات مورفولوژی گیاهان درون‌شیشه‌ای پالونیا. **AC**: زغال فعال، **NA**: نانولوله کربن

به طور کلی نتایج حاصله منجر به بهینه‌سازی هر دو گیاه در خصوص ریشه‌زایی، ارزیابی رشد شاخساره هر دو گیاه شد. همچنین بررسی صفات شیمیایی گیاه انگور و میزان فنول محیط کشت و ارتباط آن با رشد درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. پاسخ نوع گیاه به غلظت‌های مختلف زغال فعال و نانولوله کربن تفاوت جزیی مشاهده شد. خداکسکیا و همکاران (۲۰۱۲)، نیز بر روی مکانیسم مولکولی در رشد سلول‌های تکثیر شده بر روی محیط حاوی زغال فعال و نانو لوله نتایج مشابهی گزارش نمودند (۱۷). تاثیر فرم‌های مختلف کربن فعال در محیط MS بر استقرار ریزنمونه مفید بود. برخلاف نتایج این پژوهش، رومانو و همکاران (۲۰۰۲)، اثر زغال فعال را در رشد ریز نمونه‌های درون شیشه‌ای منفی گزارش دادند (۳۱). این ممکن است به دلیل تفاوت ژنوتیپ‌ها و نوع محیط کشت استفاده شده باشد. زیرا غلظت‌های مختلف زغال اثر متفاوت بر ترکیبات محیط کشت و گیاه درون شیشه‌ای دارد. شرایط رشدی گیاه برای یک گونه گیاهی، ممکن است برای رقم یا گونه دیگر به همان اندازه موثر نباشد (۲۸، ۳۱). بر خلاف انتظار تعداد شاخه در پالونیا و انگور با افزودن زغال کاهش یافت. این امکان وجود دارد که زغال فعال علاوه بر جذب مواد مضر، بطور ناخواسته موجب جذب مواد مفید نیز شود (۴۵). در حالی که تکثیر شاخساره به نوع گیاه، ارقام و غلظت سیتوکینین نیز بستگی دارد (۳۱). با انکوبه کردن ریزنمونه در محیط حاوی زغال اکسیداسیون فنولی مانع رشد شاخه نشد و حضور زغال باعث افزایش در رشد و تقویت شکل ظاهری ریزنمونه‌ها شد. این یافته‌ها با مشاهدات قبلی مطابقت داشته است که میزان قهوه‌ای شدن بافت‌های بریده شده، در مجاور محیط

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5

کشت همراه با زغال فعال کاهش یافت و باعث تقویت رشد گیاه شد (۸).

رشد ساقه در حضور مقادیر زغال، مثبت ارزیابی شد. کاربرد ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربن به عنوان ترکیب برتر برای سطح برگ هر دو گیاه مشاهده شد. همین‌طور ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر زغال فعال بهترین ترکیب در محیط کشت برای طول شاخه در پالونیا و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله کربنی برای انگور بود. در این آزمایش بهترین ریزنمونه از نظر بیشترین تعداد برگ در غلظت‌های زغال فعال به ترتیب ۴۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر برای انگور و پالونیا بود. کیفیت ظاهری در ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن بهترین کیفیت را نشان داد.

اثر نانو مواد نسبت به زغال فعال بر تعداد ریشه در انگور بیشتر بود. حداقل تعداد ریشه در ۲۰۰ میلی گرم در لیتر زغال فعال و حداکثر در ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانو کربن نشانگر اثر مثبت غلظت پایینی از نانولوله کربنی است، بیشتر می‌توان این پدیده را در اثر افزایش بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی در مجاور نانو لوله‌های کربنی بیان نمود (۱۶). در مطالعه لوپز پرز و همکاران (۲۰۰۵)، تمایز جنین در حضور زغال فعال سریع تر از محیط فاقد زغال فعال مشاهده شد (۲۳). در پژوهش حاضر، غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر زغال فعال بهترین استقرار را نشان داد (رشد جوانه، ۹ روز پس از انکوبه کردن). هنگامی که جوانه‌ها به طول سه سانتی متر (حداقل دو گره) رسیدند، آنها از ریزنمونه‌های اصلی (تک گره) جدا شدند و در محیط ریشه‌زایی قرار گرفتند. که القای ریشه‌زایی ریزنمونه انگور با غلظت کم نانولوله کربن و رشد جوانه دوبندی انگور در ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر زغال فعال بهترین نتیجه را داد. که با نتایج تانگ و همکاران (۲۰۰۰)، مطابقت داشت (۴۰)، آنها بیان کردند که حداکثر ریشه‌زایی در مجاور زغال فعال مشاهده شد. درصد ریشه‌زایی در نانولوله‌های کربنی برای هر دو گیاه بهترین نتیجه را داشت. بهترین طول ریشه در بالاترین مقادیر زغال فعال (۴۰۰ میلی گرم) برای انگور و برای پالونیا در پایین‌ترین مقدار نانولوله کربن (۵۰ میلی گرم) در لیتر در محیط کشت بود، که با نتایج تانگ و همکاران (۲۰۰۰)، مطابقت داشت (۴۰). از آنجا که اکسین ریشه‌زایی را تحریک می‌کند زغال فعال باعث جذب مقداری از اکسین می شود (۴۲)، که غلظت مناسب زغال فعال در محیط کشت اهمیت بالایی دارد.

ریشه‌زایی به یکسری عوامل بستگی دارد، که محل ریشه-زایی ممکن است بسته به عوامل متعددی متفاوت باشد. همانطور که مشاهده شد ریشه‌زایی هر دو گیاه در مجاور فرم‌های مختلف زغال رفتار متفاوتی را نشان دادند.

در دو هفته اول افزایش میزان فنول محیط کشت مشاهده شد. که در هفته سوم این میزان کاهش یافت. افزایش درمیزان فنول در هفته‌های ابتدایی ممکن است به خاطر جراحت ریزنمونه باشد. که احتمالاً در هفته سوم با جذب مواد ناخالص از جمله فنول از اثرات مخرب آنها جلوگیری می‌شود (۱۹).

در این پژوهش تیمار با ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال، در بین سایر غلظت‌های زغال تاثیر بیشتری بر صفات اندازه گیری شده در نمونه درون‌شیشه‌ای انگور داشت. که با نتایج علیزاده و همکاران (۲۰۱۸)، مشابه بود (۶). آنها بیان کردند بیشترین اثر در غلظت بالای زغال فعال (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بدست آمد. با توجه به مشاهدات لوپز پرز و همکاران، (۲۰۰۵)، اولاه، (۲۰۱۷)، لوپز آرانالدوس و همکاران، (۲۰۰۱)، اثر مثبت زغال فعال در القای کالوس و میزان زنده‌مانی کالوس بر روی محیط کشت، نتایج مشابه و مثبتی در میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌های انگور در غلظت‌های بالای زغال فعال وسایر غلظت‌های نانولوله کربن در شرایط درون‌شیشه‌ای به دست آمد. که با نتایج لگراند و بوازا (۱۹۹۱)، بر روی *Cuchorium* مطابقت داشت. با این حال در بین سایر غلظت‌های زغال ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله کربنی بیشترین

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5

اثر را بر صفات مورفولوژی گیاه درون‌شیشه‌ای پالونیا و انگور داشته است. که می‌توان این دو میزان غلظت زغال را برای پژوهش‌های بعدی پژوهشگران و شرکت‌های تجاری تولید کننده گیاهان کشت بافتی به عنوان منابع کربن جذب کننده فنول معرفی کرد.

در طول رشد و نمو درون شیشه‌ای، بافت‌های گیاهی نه تنها مواد غذایی محیط کشت را جذب می‌کنند، بلکه موادی را آزاد می‌کند که در محیط کشت تجمع می‌یابند. این مواد مانند فنول‌ها، ممکن است اثرات زیان‌آور فیزیولوژیکی در بافت‌های کشت شده داشته باشند، مانند سایر گونه‌های چوبی، بافت‌های انگور سطح بالایی از پلی-فنول و تانن از خود نشان می‌دهند (۳۲). در مطالعه حاضر زغال در شروع کشت و همچنین محیط ریشه‌زایی افزوده شد تا چنین مشکلاتی را به حداقل برساند، و غلظت بهینه آن برای استفاده در آزمایشگاه‌ها و تولید کنندگان تجاری گیاهان و پژوهش‌های بعدی مثمرثمر باشد. با توجه به افزایش مطالعات روز افزون در زمینه کشت بافت و علوم وابسته به آن در ژنتیک مولکولی، انتقال ژن، امتزاج پروتوپلاست و نیاز به تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان، مطالعات گسترده‌تر به منظور ارزیابی کاربرد منابع زغال ضروری است. در جمع‌بندی نهایی لازم به ذکر است که می‌توان از تیمارهای ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال و یا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله‌های کربن به عنوان منابع کربن جذب کننده فنول در محیط‌های کشت انگور و پالونیا استفاده کرد. نتایج این پژوهش با اندکی تغییر در سایر گیاهان و ریزافزایی تجاری قابل استفاده خواهد بود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم کشارزی و منابع طبیعی گرگان انجام شده است. نویسندگان از آقای مهندس صادق آتشی، کارشناس آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی به دلیل همکاری در اجرای این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. سبحانی‌نژاد، ع.، سلوکی، م.، و فاضلی‌نسب، ب. ۱۳۹۶. بهینه سازی کالوس زایی و تاثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی سیاه دانه در شرایط آزمایشگاهی. مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)، ۸ (۲)،صفحات ۱۶۵-۱۸۴.

۲. قزلباش، س.، قادری، ا.، بداقی، ح. ا.، قسیمی حق،ز.، کاشفی، م.، و زارع کاریزی، ا .ر. ۱۳۹۵ . اثار آنتی اکسیدانها و محیط کشت بر بیوسنتز ترکیبات فنولی محدودکننده رشد در کشت درون شیشه‌ای گیاه نعناع وحشی (*Mentha arvensis* L)، فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۰، صفحات ۱ – ۹.

۳. علیزاده، مهدی. ۱۳۹۰. راهنمای کاربران کشت بافت گیاهی و ریزازدیادی، انتشارات نوروزی گرگان، ایران.

4. Alizadeh, M., Singh, S. K., Patel, V.B., Bhattacharya, R. C., and Yadav, B. P., 2010. In vitro responses of grape rootstocks to NaCl. Biologia Plantarum, 54(2), PP: 381-385.

5. Alizadeh, M., Singh, S.K., Patel, V.B., Deshmukh, P.S. 2018. *In vitro* clonal multiplication of two grape (*vitis* spp.) rootstock genotypes. Plant tissue cult biotechnol 28: 1-11.

6. Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., Davison, A.W. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll ‘a’ and ‘b’ in lichens and higher plants. Environ. exp. Bot. 32: 85-90.

7. Cresswell, R. and C. Nitsch., 1975. Organ culture of Eucalyptus grandis L. Planta, 125, PP: 87-90.

8. Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., Kallitsis. I., and Galiotis, C. 2008. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. Carbon. 46 (6): 833-840.

9. El-Showk, S., and El-Showk, N., 2003. The Paulownia tree. An alternative for sustainable forestry, Crop Development, Morocco, PP: 1-8.

10. Figueiredo, S. F. L., Albarello, N., and Viana, V. R. C., 2001. Micropropagation of Rollinia

mucosa (JACQ.) baill. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37 (4), PP: 471-475.

11. Haberlandt, G., 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch. Wien, math.-naturw. Klasse, 111, PP: 1913-1921.

12. Halhouli, K.A., Darwish, N.A, Aldhoon, N.M., 1995. Effects of pH and inorganic salts on the adsorption of phenol from aqueous systems on activated decoloring charcoal. Separ Sci Technol, 30 (17), PP:3313–3324.

13. Huang, L. C., Lee, Y. L., Huang, B. L., Kuo, C. I., and Shaw, J. F., 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 38 (4), PP: 358.

14. Huang, Y., Li, N., Ma, Y., Du, F., Li, F., He, X., Lin, X., Gao, H., and Chen, Y., 2007. The influence of single-walled carbon nanotube structure on the electromagnetic interference shielding efficiency of its epoxy composites. Carbon, 45 (8), PP: 1614-1621.

15. Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., and Villagarcia, H., 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS NANO, 6 (3), PP: 2128-2135.

16. Kim, D.H.; Gopal, J.; Sivanesan, I. Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed. RSC Adv. 2017, 7, 36492–36505.

17. Krishna, H., Sairam, R. K., Singh, S. K., Patel, V. B., Sharma, R. R., Grover, M., Nain, L., and Sachdev, A., 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horticulturae., 118 (2), PP: 132-138.

18. Lee, N., Wetzstein, H.Y., 1990. In vitro propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 115: 324-9.

19. Legrand, B., & Bouazza, A., 1991. Changes in peroxidase and IAAoxidase activities during adventitious bud formation from smallroot explant of Cichorium intybys L.: influence of glucose. J. Plant Physiol, 138, PP: 102–106.

20. López Arnaldos, T., Muñoz, R., Ferrer, M. A., and Calderón, A. A., 2001. Changes in phenol content during strawberry (Fragaria× ananassa, cv. Chandler) callus culture. Physiologia Plantarum, 113 (3), PP: 315-322.

21. López-Pérez, A. J., Carreño, J., Martinez-Cutillas, A., and Dabauza, M., 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (Vitis vinifera L.) induced by activated charcoal. Vitis, 44 (2), PP: 79-85.

22. Mhatre, M., Salunkhe, C.K., Rao, P.S., 2000. Micropropagation of Vitis vinifera L.: Towards an improved protocol. Sci. Hort., 84: 357-63.

23. Mitsukuri, K., Mori, G., Johkan, M., Shimada, Y., Mishiba, K. I., Morikawa, T., and Oda, M., 2009. Effects of explant position and dark treatment on bud formation in floret culture of Ponerorchis graminifolia Rchb. f. Scientia Horticulturae, 121 (2), PP: 243-247.

24. Olah, R., 2017. The use of activated charcoal in grapevine tissue culture. Vitis, 56 (4), PP: 161-171.

25. Ozyigit, I. I., 2008. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (Gossypium hirsutum L.) shoot tips. African Journal of Biotechnology, 7 (8), PP: 1145-1150.

26. Ozyigit, I. I., Kahraman, M. V., and Ercan, O., 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (Gossypium hirsutum L.). African Journal of Biotechnology, 6 (1), PP: 003-008.

27. Parzymies, M. Nano-Silver Particles Reduce Contaminations in Tissue Culture but Decrease Regeneration Rate and Slows Down Growth and Development of Aldrovanda vesiculosa Explants. Appl. Sci. 2021, 11, 3653. https://doi.org/ 10.3390/app11083653

28. Rameshaiah, G. N., Pallavi, J., and Shabnam, S., 2015. Nano fertilizers and nano sensors–an attempt for developing smart agriculture. International Journal of Engineering Research and General Science, 3 (1), PP: 314-320.

29. Romano, A., Barros, S., and Martins-Loução, M. A., 2002. Micropropagation of the Mediterranean tree Ceratonia siliqua. Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 68 (1), PP: 35-41.

30. Roubelakis-Angelakis, K.A., 2001. Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Kluwer Academic Publishers, London, 474p.

31. Sarmast, M.; Salehi, H.; Khosh-Khui, M. Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of Araucaria excelsa R. Br. var. glauca explants. Acta Biol. Hung. 2011, 62, 477–484.

32. SAS Institute Inc., 2003. The SAS System for Windows, Release 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

33. Sharma, R. R., 1994. In vivo and in vitro polyphenol oxidase activity in grape (Vitis vinifera L.). (Doctoral dissertation, Thesis, Post Graduate School, IARI, New Delhi).

34. Singh, S.K., Khawale, R.N., Singh, S.P., 2004. Techniques for rapid in vitro multiplication of Vitis vinifera L. cultivars. J. Hort. Sci. Biotech., 19: 267-72.

35. Singh, S.K., Sharma, H.C., Singh, S.P., Sharma, R.R., 2000. Propagation of grape through repetitive micro-cutting technique. Indian Hort., 3: 14-15.

36. Sudarsono, A., Goldy, R.G., 1991. Growth regulator and axillary bud position effects on in vitro establishment of Vitis routondifoila. HortSci., 26: 304-7.

37. Taha, R.A., Hassan, M.M., Ibrahim, E.A. *et al.* Carbon nanotubes impact on date palm in vitro cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **127,** 525–534 (2016). https://doi.org/10.1007/s11240-016-1058-6

38. Tang, H., Ren, Z., and Krczal, G., 2000. Improvement of English walnut somatic embryo germination and conversion by desiccation treatments and plantlet development by lower medium salts. In Vitro Cell. Deve. Biol. Plant, 36, PP: 47-50.

39. Thies, K.L., Graves, C.H., 1992. Meristem micropropagation protocols for Vitis rotundifolia Michx. HortSci., 27: 447-9.

40. Thomas, T. D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26 (6), PP: 618-631.

41. Thorpe, T. A., 2007. History of plant tissue culture. Molecular Biotechnology, 37 (2), PP: 169-180.

42. Torregrosa, L., Bouquet, A., 1995. In vitro propagation of Vitis × Muscadinia hybrids by microcuttings or axillary budding. Vitis, 34: 237-8.

43. Vahdatpour, F., Mashayekhi, K., and Piri, Z. M., 2009. Investigation of Ontioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of ulmas pavrifolia jasq. Journal of plant production (Journal of aAgricultural Sciences and Natural Resources)., 2, PP: 1-14.

44. Yadav, N. K., Vaidya, B. N., Henderson, K., Lee, J. F., Stewart, W. M., Dhekney, S. A., and Joshee, N., 2013. A review of Paulownia biotechnology: a short rotation, fast growing multipurpose bioenergy tree. American Journal of Plant Sciences, 4 (11), 2070.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.4.5
مقاله پژوهشی

Application of activated charcoal and carbon nanotubes on phenol exclusion from tissue culture media in Grapevine and Paulownia

Zarei M., Alizadeh M.*, Khorasaninejad S. and Khoshal Sarmast M.

Dep. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

Numerous factors limit the plant propagation under *in vitro* conditions. Tissue browning is a serious problem in the establishment of explants in woody perennials and complicates the successful implementation of *in vitro* techniques. To solve this problem, application of activated charcoal resources was used, hence by controlling the effect on browning of plant tissue culture media the concentration of phenolic compounds was reduced. Furthermore, some easy methods were followed to solve the problem of oxidative browning, especially in Paulownia and Grapevine explants. The present study was conducted in Tissue Culture Laboratory, Dep. of Horticulture, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The basal MS medium supplemented with IBA (2 and 4 mg / l, for Grapevine and Paulownia, respectively), was fortified with different concentrations of activated charcoal and carbon nanotubes (0, 50, 100, 200, 400 mg/l). The estimation of phenolic compounds was performed with the calorimetric Folin-Ciocaltea method at 760 nm. The experiment was undertaken as completely randomized design. The results showed that both activated charcoal and carbon nanotubes had positive and significant effects on the absorption of phenol in the culture medium and the propagation of *in vitro* explants. The results of this study indicated that concentrations of 400 mg/l activated charcoal and 200 mg/l carbon nanotubes can be used as phenol-absorbing carbon sources in the culture media of these plants. Also, after minor modifications, the results of the present may be utilized in commercial propagation of other crops and plant species.

Keywords: Phenol, Browning, Activated charcoal, Carbon nanotubes