مجله علمی ترویجی گل و گیاهان زینتی (۱۳۹۵)، ۱(۲): ۵۱- ۵۸

کاربرد ذغال فعال، اسید آسکوربیک و فلوروگلوسینول در کنترل قهوه‌ای شدن کالوس و القاء اندام‌زایی غیرمستقیم در انجیر معابد (*Ficus religiosa* L.)

حسامی محسن[۱]، دانشور محمد حسین[۱*]، لطفی جلال آبادی امین[۲]

۱. گروه علوم باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

* mhdaneshvar2004@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰٤/۰۷، تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹٤/۱۰/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۳

چکیده

انجیر معابد (*Ficus* religiosa) درخت جنگلی چند منظوره با طول عمر طولانی می‌باشد. این گیاه ارزش زینتی و دارویی داشته و در مراسم مذهبی از آن استفاده می‌شود. میزان تکثیر این گیاه در طبیعت پایین است. این پژوهش با هدف بررسی اثر اسید آسکوربیک، فلوروگلوسینول و ذغال فعال در کنترل قهوه‌ای شدن کالوس و میزان باززایی کالوس حاصل از برگ گیاهک انجیر معابد در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. بدین منظور، از غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، فلوروگلوسینول (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و ذغال فعال (۲ و ٤ گرم در لیتر) در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد بهترین تیمار جهت کنترل فنل، با افزودن ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید اسکوربیک به محیط کشت با حداقل تعداد واکشت (۲-۳) به دست آمد. بیشترین درصد باززایی (۱۰۰٪)، بیشترین تعداد شاخساره (۵/۵٦) و همچنین بیشترین تعداد واکشت (۱۱/۳۳) از تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول بدست آمد. بطور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح بالایی از اسید آسکوربیک و ذغال فعال به محیط کشت، به طور قابل توجهی منجر به کنترل تولید ترکیبات فنلی ریزنمونه‌ها می‌گردد.

کلمات کلیدی: انجیر معابد، تکثیر شاخساره، ریزکشت، شرایط درون شیشه‌ای، گیاه دارویی

مقدمه

انجیر معابد (*Ficus religiosa* L.) از تیره Moraceae و از مشهورترین گونه‌های جنس Ficus می‌باشد. جنس Ficus دارای ۸۰۰ گونه است. این گیاه بومی هند و بنگلادش است و به طور گسترده‌ای در سراسر جهان کاشته می‌شود (McFarland 1944; Galil 1984). انجیر معابد گیاهی است که گفته می‌شود بودا در زیر آن متولد شده است. همچنین در کشور هاوائی، این گیاه در نزدیکی معابد کاشته می‌شود. این گیاه تنومند و پر شاخه و برگ به علت

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]

شکل و فرم زیبای آن می‌تواند به عنوان یک گیاه نمونه در فضای سبز استفاده شود. ازدیاد جنسی انجیر معابد در کشور هاوایی، به علت عدم حضور زنبور گرده افشان، امکان پذیر نمی‌باشد. بنابراین مناسب‌ترین روش تکثیر انجیر معابد در این جزیره از طریق قلمه و یا کشت بافت است ولی در فلسطین اشغالی، گرده افشانی این گیاه بوسیله زنبور گرده افشان *Blastophaga quadraticeps* با موفقیت صورت گرفته است (Galil & Eisikowitch 1968). انجیر معابد گیاهی چند ساله است که در آب و هوای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری رشد کرده و دارای شاخه‌های گسترده، نیمه برگ‌ریز یا به طور کامل برگ‌ریز می‌باشد. برگ‌های این گیاه پهن و تخم مرغی شکل، براق و چرم مانند و به رنگ سبز تیره می‌باشد. طول برگ ۱۸-۱۲ سانتی‌متر و نوک آن دم مانند است. میوه‌های انجیر معابد گرد، سبز رنگ و عرض آن ۱/۵سانتی‌متر است که هنگام رسیدن، به رنگ بنفش با نقطه‌های قرمز مشاهده می‌شود (Ghani 2003). بسیاری از مردم کشور هند از عصاره انجیر معابد به عنوان تقویت کننده مغز، استفاده می‌کنند. این گیاه در طب سنتی هند برای بیماری‌های مختلفی استفاده می‌شود (Chandrasekar *et al*. 2010). میوه انجیر معابد دارای بسیاری از خواص دارویی از جمله خواص ضد دیابت، ضد سرطان، ضد تشنج و ضد ویروس است (Parasharami *et al*. 2014). یکی از روش‌های تکثیر انجیر معابد با بذر می‌باشد. از آن‌جا که گرده افشانی این گیاه به صورت ناقص انجام می‌گیرد، میزان جوانه‌زنی بذر آن پایین است (Hassan *et al*. 2009). همچنین تکثیر این گیاه به وسیله قلمه، نیاز به شرایط اقلیمی خاص دارد (Salehi-Salmi & Hesami 2016). از آنجا که انجیر معابد ارزش زینتی و دارویی داشته، بنابراین تکثیر انبوه این گیاه بسیار حائز اهمیت است. لذا کشت بافت گیاهی می‌تواند در تولید انبوه این گیاه مفید واقع شود (Siwach & Gill 2013). با این حال، پژوهش‌های کمی بر ازدیاد درون شیشه‌ای انجیر معابد صورت گرفته است (Jaiswal & Narayan 1985; Deshpande *et al*. 1998; Hassan *et al*. 2009; Siwach & Gill 2011, 2013). بسیاری از گیاهان چوبی و تعدادی از گیاهان علفی، وقتی در شرایط درون شیشه‌ای کشت می‌شوند، موجب قهوه‌ای شدن ریزنمونه و تولید فنل می‌گردند (Cördük & Aki 2011). قهوه‌ای شدن[1] ریز نمونه‌ها و مرگ احتمالی بافت گیاهی در طول مرحله اول کشت بافت گیاهی یک مشکل همیشگی است. قهوه‌ای شدن از طریق فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO) و پراکسیداز بوسیله تحریک واکنش دفاعی ناشی از زخم شدن رخ می‌دهد (Pan & Staden 1999). پلی فنل اکسیداز واکنش بین ترکیبات فنلی مختلف و اکسیژن مولکولی تولیدی کوئینون‌ها که پروتئین‌های بسیار واکنش‌پذیر و غیراختصاصی هستند را کاتالیز می‌کند و تولید رنگدانه تیره ملانین می‌کند (Onay & Jeffree 2000; Leng *et al*. 2009). در سلول‌های سالم، آنزیم‌ها و سوبستراهای آنها به هم متصل نمی‌شوند. زیرا پلی‌فنل‌ها، سوبستراهای پلی فنل اکسیداز در واکوئل‌ها هستند، در حالیکه این آنزیم در پلاستیدها یا کلروپلاست‌ها موجود هستند. موقعی‌که سلول‌ها در طول برش ریزنمونه‌ها زخمی می‌شوند، واکنش قهوه‌ای شدن شروع می‌گردد. وجود یک همبستگی مثبت بین فعالیت پلی فنل اکسیداز و سطح ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در گونه‌های مختلف درختان گزارش شده است (Sharma & Singh 2002). نقش مهم آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مختلف از قبیل پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز در قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها گزارش شده است (Laukkanen *et al*. 1999). فعالیت آنزیم‌های مرتبط با اکسیداسیون فنل‌ها همچنین توسط فاکتورهای محیطی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. مواد افزودنی مختلف که می‌تواند از تولید ترکیبات فنلی جلوگیری کند یا می‌تواند مواد فنلی بازدارنده را از محیط کشت حذف کند، می‌توانند در کنترل فنل و قهوه‌ای شدن

[1] Browning

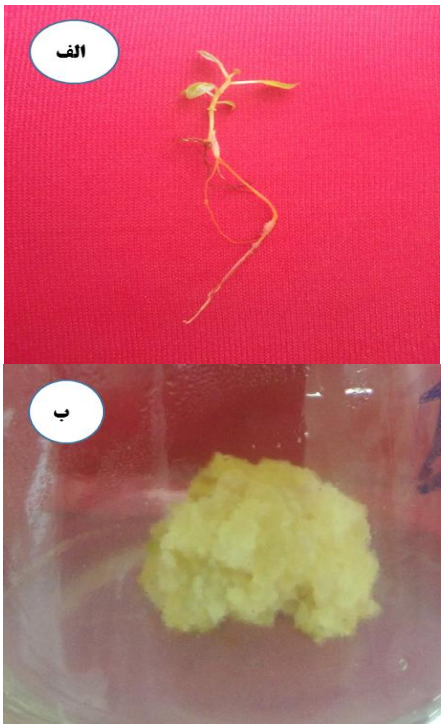
[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]

موثر باشند. موادی از قبیل آنتی اکسیدان‌ها، مواد تشکیل دهنده کلات‌ها یا جذب کننده‌های سطحی ترکیبات فنلی را از محیط کشت حذف می‌کنند (Thomas 2008). اندام‌زایی غیرمستقیم که بوسیله تولید کالوس صورت می‌گیرد دارای فواید زیادی از جمله مطالعه مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان، تولید متابولیت‌های ثانویه، تنوع سوموکلونال و روشی برای انتقال ژن به صورت پایدار می باشد (پیرک ۱۹۷۶). تنها گزارش از اندام‌زایی غیرمستقیم انجیر معابد مربوط به مطالعه جیسوال و نارایان (۱۹۸۵) است، که در این مطالعه از ریزنمونه میانگره درخت بالغ انجیر معابد به منظور تولید کالوس استفاده کردند و سپس با انتقال کالوس تولید شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و با واکشت‌های متعدد، شاخساره تولید نمودند. با این حال، هیچ مطالعه‌ای مبنی بر تاثیر آنتی اکسیدان‌ها و جذب کننده‌های سطحی بر کنترل قهوه‌ای شدن کالوس و اندام‌زایی انجیر معابد صورت نگرفته است. لذا پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر ذغال فعال، اسید آسکوربیک و فلوروگلوسینول بر کنترل قهوه‌ای شدن کالوس و اندام‌زایی غیرمستقیم از ریزنمونه برگ گیاهک انجیر معابد انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در پاییز سال ۱۳۹۳ بر روی گیاه انجیر معابد در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انجام گردید. میوه‌های انجیر معابد از یک درخت ۵۰ ساله در دانشگاه در خرداد ماه جمع‌آوری شدند و سپس در سردخانه در دمای ۱±٤ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰٪ نگهداری شدند. بذرها پس از ۳۰ دقیقه شست و شو با آب جاری، به مدت ۱۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰٪ و ۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱۰٪ ضد عفونی شدند. پس از ۳ بار شست و شو با آب مقطر استریل به محیط کشت MS (Murashige & Skoog 1962) ۰/۱ غلظت و pH برابر ۵/۸ ، ساکارز ۳٪ و آگار ۰/٦٪ منتقل شدند. کلیه مواد، ظروف و محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. شیشه‌های کشت برای جوانه‌زنی، در اتاق رشد با دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور تولید کالوس از ریزنمونه برگ گیاهک تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای (شکل ۱- الف) استفاده شد. پس از تولید کالوس در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (شکل ۱- ب)، کالوس‌ها به محیط کشت اندام‌زایی MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند.



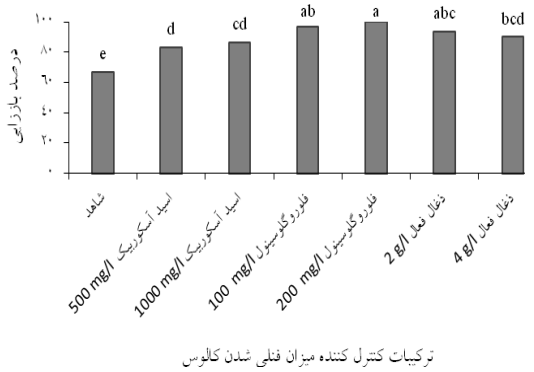
شکل ۱- مراحل اندام‌زایی غیر مستقیم از ریزنمونه برگ گیاهک انجیر معابد. (الف) جوانه‌زنی بذر انجیر معابد در محیط کشت MS ۰/۱ غلظت، (ب) کالوس تولید شده از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]

به منظور بررسی کنترل فنل حاصل از کالوس، از تیمارهای مختلف ذیل در محیط کشت اندام‌زایی مذکور استفاده شد: شاهد (بدون مواد افزودنی)، اسید آسکوربیک (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، فلوروگلوسینول (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و ذغال فعال (۲ و ٤ گرم در لیتر). شیشه‌های کشت در شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد در اتاقک رشد قرار داده شدند. این پژوهش به صورت طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ نمونه) بر روی شاخص‌های درصد باززایی، تعداد شاخساره، طول شاخساره و تعداد واکشت مورد بررسی قرار گرفت. داده-های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۹/۳) تجزیه و تحلیل شد و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel (۲۰۱۳) رسم گردید. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

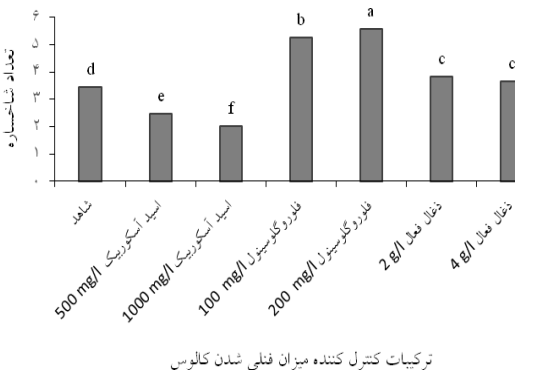
نتایج و بحث

نتایج تیمارهای مختلف بر درصد باززایی پس از ٦٠ روز نشان داد که بیشترین درصد باززایی با میانگین ۱۰۰ درصد در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول (شکل ٦- الف) مشاهده گردید که از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با سایر تیمارها بجز تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول و ۲ گرم در لیتر ذغال فعال (شکل ٦- ب) تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین درصد باززایی با میانگین ٦٦/٦٦ درصد مربوط به تیمار شاهد (شکل ٦- ج) بود (شکل ۲). بیشترین تعداد شاخساره با میانگین ۵/٥٦ شاخه در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول مشاهده گردید که از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین تعداد شاخساره با میانگین ۲/۰۳ شاخه مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک بود (شکل ۳).



شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف بر درصد باززایی از ریزنمونه برگ گیاهک انجیر معابد در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA.

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.



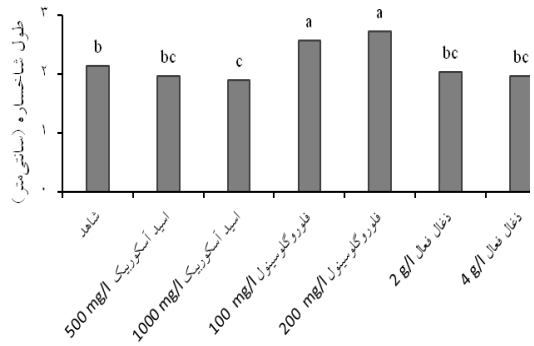
شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف بر تعداد شاخساره از ریزنمونه برگ گیاهک انجیر معابد در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA.

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.

بیشترین طول شاخساره با میانگین ۲/۷۳ سانتی‌متر در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول مشاهده گردید که از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با سایر تیمارها بجز تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول (۲/٥٦ سانتی‌متر) تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین طول شاخساره با میانگین ۱/۹۰ سانتی‌متر مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک بود (شکل ٤). همچنین بیشترین تعداد واکشت

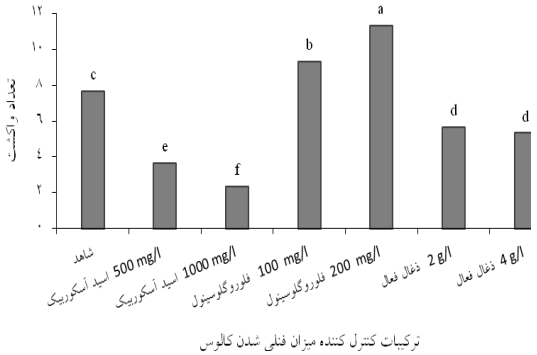
[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]
[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

با میانگین ۱۱/۳۳ در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول مشاهده گردید که از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. کم‌ترین تعداد واکشت با میانگین ۲/۳۳ مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک (شکل ٦- د) بود (شکل ۵).



شکل ٤- اثر تیمارهای مختلف بر طول شاخساره از ریزنمونه برگ گیاهک انجیر معابد در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA.

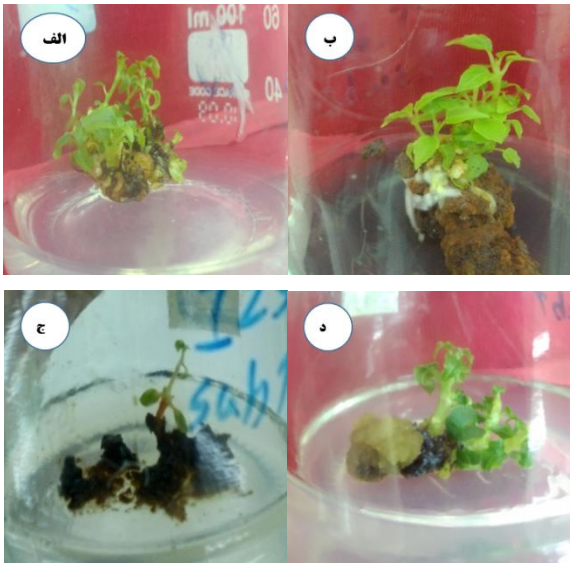
حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.



شکل ۵- اثر تیمارهای مختلف بر تعداد واکشت از ریزنمونه برگ گیاهک انجیر معابد در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA.

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.

به طور کلی فلوروگلوسینول موجب افزایش رشد کالوس، افزایش تعداد و طول شاخساره، درصد باززایی و تعداد و طول ریشه می‌شود (Teixeira da Silva *et al.* 2013). همان طور که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد فلوروگلوسینول موجب افزایش درصد باززایی و تعداد و طول شاخساره شد. از طرفی فلوروگلوسینول موجب افزایش مواد فنلی در محیط کشت گردید و در نتیجه افزایش تعداد واکشت به منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها را به دنبال داشت. فلوروگلوسینول یک ترکیب فنلی بوده که می‌تواند نقش تنظیم کننده رشد گیاهی داشته باشد. افزودن این ماده به محیط کشت می‌تواند بر میزان تولید فنل توسط ریزنمونه تاثیر گذار باشد که بستگی به گونه گیاهی و نوع ریزنمونه دارد (James & Thurbon 1979).



شکل ٦- اثر تیمارهای مختلف بر کنترل قهوه‌ای شدن کالوس و اندام‌زایی غیرمستقیم از ریزنمونه برگ گیاهک انجیر معابد. الف) ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول، ب) ۲ گرم در لیتر ذغال فعال، (ج) شاهد، (د) ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]

سیواچ و گیل (۲۰۱۱)، به بررسی تاثیر سولفات آدنین، گلوتامین و فلوروگلوسینول در محیط کشت WPM به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر بنزیل آمینو پیورین (BAP) و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید (IAA) به منظور پرآوری شاخساره در ریزنمونه گره گیاه انجیر معابد پرداختند. آن‌ها گزارش دادند که میانگین تعداد شاخساره در این محیط کشت ۱۳/۹ بود که با افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوتامین، ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سولفات آدنین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فلوروگلوسینول، میانگین تعداد شاخساره‌ها به ۳۵/٦۵ رسید و به شکل معنی‌داری افزایش یافت. ذغال فعال، دارای شبکه‌های زیادی از منافذ با سطح داخلی بزرگی است که روی آن، تمام مواد (گازها، ترکیبات جامد) می‌توانند جذب شوند و درنتیجه باعث تنظیم مواد موجود در محیط کشت می‌شود (پیرک ۱۹۷٦). همانطور که نتایج این پژوهش نشان داد، ذغال فعال در افزایش درصد باززایی و کاهش تعداد زیرکشت به منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن کالوس‌ها موثر بود. تیسرات (۱۹۷۹) در جریان تکثیر درون شیشه‌ای خرما مشاهده کرد که با استفاده از ذغال فعال، از طریق کاهش قهوه‌ای شدن، شرایط برای رشد مساعد گردید. کاهش رشد کالوس در غلظت بیشتر ذغال فعال ممکن است به این دلیل باشد که ذغال علاوه بر محصولات اکسیداسیونی فنلی، باعث جذب بعضی از ترکیبات مانند تنظیم کننده‌های رشد که برای رشد ضروری می‌باشند نیز می‌گردد که نکته‌ای منفی برای آن به شمار می‌آید (Marks & Simpson 1990). 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 آسکوربیک از بروز این مسئله به میزان زیادی ممانعت به عمل آمد و با نتایج بررسی حاضر در مورد اسید آسکوربیک مطابقت داشت، به این صورت که در محیط کشت دارای اسید آسکوربیک ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین کاهش در قهوه‌ای شدن کالوس و واکشت مشاهده گردید. همچنین اسید آسکوربیک به عنوان ماده‌ای آنتی اکسیدان و ضد قهوه‌ای شدن در کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی استفاده شده است که با نتایج بررسی حاضر مطابقت داشت (Elmore *et al.* 1990). از طرفی اثر اسید آسکوربیک بر میزان باززایی و تولید شاخساره بستگی به گونه گیاهی، نوع ریزنمونه، نوع محیط کشت دارد (Ndakidemi *et al.* 2014).

دستورالعمل ترویجی

جهت افزایش میزان باززایی و کنترل قهوه‌ای شدن کالوس حاصل از ریزنمونه برگ گیاه انجیر معابد موارد ذیل پیشنهاد می‌شود:

۱) استفاده از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به منظور کنترل قهوه‌ای شدن کالوس.

۲) استفاده از غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول و همچنین ۲ و ٤ گرم در لیتر ذغال فعال در محیط کشت مذکور به منظور افزایش میزان باززایی.

۳) استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلوروگلوسینول در محیط کشت مذکور به منظور افزایش تعداد و طول شاخساره‌های تولید شده.

منابع

پیریک آر ال ام (۱۹۷٦). مبانی کشت بافت‌های گیاهی، (مترجمین: باقری ع ر، صفاری م. ۱۳۸٤)، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

Chandrasekar SB, Bhanumathy M, Pawar AT, Somasundaram T (2010). Phytopharmacology of *Ficus religiosa* Rev.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]

Pharmacogn. 4:195-199.

Cördük N, Aki C (2011). Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana*, an endemic medicinal herb of Turkey. Romanian Biotechnol Lett. 16: 6760–6765.

Deshpande SR, Josekutty PC, Prathapasenam G (1998). Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa* L. Plant Cell Rep. 17(6–7): 571–573

Elmore H, Samples B, Sharma S, Harrison M (1990). Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media. Plant Cell Tiss Org Cult. 20: 131-135.

Galil J (1984). *Ficus religiosa* L. – the tree-splitter. Bot J Linn Soc. 88: 185–203.

Galil J, Eisikowitch D (1968). On the pollination ecology of *Ficus religiosa* in Israel. Phytomorphol. 18: 356-363.

Ghani A (2003). Medicinal plants of bangladesh with chemical constituents and uses. Asiatic Society of Bangladesh. 2nd edn, pp. 236.

Hassan AKMS, Afroz F, Jahan MAA, Khatun R (2009). *In vitro* regeneration through apical and axillary shoot proliferation of *Ficus religiosa* L.—A multipurpose woody medicinal plant. Plant Tiss Cult Biotechnol. 19(1): 71–78.

Huang LC, Lee YL, Huang BL, Kou CI, Shaw JF (2002). High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 38: 358-365.

Jaiswal VS, Narayan P (1985). Regeneration of plantlets from the callus of stem segments of adult plants of *Ficus religiosa* L. Plant Cell Rep. 4:256–258

James DJ, Thurbon IJ (1979). Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M 9. J Hortic Sci. 54:309–311

Laukkanen H, Häggman H, Kontunen-Soppela S, Hohtola A (1999). Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. Physiol Plant. 106: 337-343.

Leng P, Su S, Wei F, Yu F, Duan Y (2009). Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. Acta Hort. 106: 337-343.

Marks T, 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.

McFarland GB (1944). Thai-English Dictionary. Stanford University press, Stanford, California, pp. 601.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15: 473- 497.

Ndakidemi CF, Mneney E, Ndakidemi PA (2014). Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in *in vitro* culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. Am J Plant Sci. 5: 187-191.

Onay A, Jeffree C (2000). Somatic embryogenesis in Pistachio (*Pistacia Vera* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant. 38: 361-390.

Pan MJ, Staden JV (1999). Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. J Plant Growth Regulation. 29: 3. 135-141.

Parasharami V, Yadav P, Mandkulkar S (2014). *Ficus religiosa* L.: Callus, suspension culture and lectin activity in fruits and *in vitro* regenerated tissues. British Biotechnol J. 4(2): 215-227.

Salehi-Salmi M, Hesami M (2016). Time of collection, cutting ages, auxin types and concentrations influence rooting *Ficus religiosa* L. stem cuttings. J Appl Environ Biol Sci. 6(1): 124-132.

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]

Sharma R, Singh S (2002). Etiolation reduces phenolic content and polyphenol oxidase activity at the pre-culture stage and *in vitro* exudation of phenols from mango explants. Trop Agric. 79: 94-99.

Siwach P, Gill AR (2011). Enhanced shoot multiplication in *Ficus religiosa* L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. Physiol Mol Biol Plants. 17(3):271–280.

Siwach P, Gill AR (2013). Micropropagation of *Ficus religiosa* L. via leaf explants and comparative evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity in the micropropagated and conventionally grown plants. 3 Biotech. doi: 10.1007/s13205-013-0175-8.

Teixeira da Silva JA, Dobránszki J, Ross S (2013). Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro* Cell Dev Biol Plant. 49:1–16.

Tisserat B (1979). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. J Exp Bot. 30: 1275-1283.

Thomas TD (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnol Advances. 26(6): 618–631.

Activated Charcoal, Ascorbic Acid and Phloroglucinol Control Callus Browning and Induce Indirect Organogenesis in *Ficus religiosa* L.

Hesami Mohsen[1], Daneshvar Mohammad Hossein[*1], Lotfi-Jalalabadi Amin[2]

1. Department of Horticultural Science, Ramin University of Agriculture and Natural Resources, Khoozestan, Iran.
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Ramin University of Agriculture and Natural Resources, Khoozestan, Iran.

[*] mhdaneshvar2004@yahoo.com

Abstract

Bodhi tree (*Ficus religiosa*) is a long-lived valuable multi-purposed forest tree. The tree is exploited due to its ornamental and medicinal value and is used in religious ceremonies. The propagation rate in natural habitat is low. The current study was conducted to investigate the effects of ascorbic acid, phloroglucinol and activated charcoal in controlling callus browning and shoot multiplication in *in vitro* culture of *Ficus religiosa* plantlets using callus from leaf segments. The treatments included various concentrations of ascorbic acid (500 and 1000 mg/l), phloroglucinol (100 and 200 mg/l) and activated charcoal (2 and 4 g/l) added to the basal MS medium supplemented with 1.0 mg/l BAP along with 0.1 mg/l IBA. The culture medium containing 1000 mg/l of ascorbic acid controlled callus browning effectively. In this medium the least number of sub-cultures (2-3) were carried out. The highest regeneration frequency (100%), the maximum number of multiple shoots (5.56) and the highest number of subcultures (11.33) were obtained on basal medium supplemented with 200 mg/l phloroglucinol. Finaly, the results of the current study revealed that production of phenolic compounds of explants was significantly controlled by incorporating higher levels of ascorbic acid and activated charcoal into the culture medium.

Keywords: *Ficus religiosa*, *In vitro*, Medicinal plant, Shoot multiplication, Subculture.

[Downloaded from flowerjournal.ir at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.5.0]