مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۱۴۹-۱۴۱)

اثر زمان نمونه‌گیری، نوع و آرایش کشت ریزنمونه‌ها و نوع آنتی‌اکسیدان بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

محمدباقر یاری[۱]، منصور غلامی[۲]* و محمود اثنی عشری[۳]
۱، ۲، ۳، دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۰/۲/۲۵)

چکیده

در این تحقیق، چهار آزمایش مجزا جهت مطالعه عوامل مؤثر بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های دو ژنوتیپ گردو Z60 و Z63 جمع‌آوری شده از ایستگاه تحقیقات گردوی تویسرکان اجرا گردید. آزمایش‌ها شامل بررسی پنج زمان نمونه‌گیری، چهار نوع ریزنمونه، سه حالت قرار دهی ریزنمونه روی محیط کشت و شش نوع ماده آنتی‌اکسیدان بودند. در هر دو ژنوتیپ، ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و تک گره که در اردیبهشت‌ماه گرفته شدند به دلیل داشتن نقطه فعال رشد و نیز شرایط فیزیولوژیکی مناسب بیشترین رشد و استقرار را دارا بودند و نسبت به سایر ریزنمونه‌ها از این نظر اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. همچنین ریزنمونه‌هایی که به صورت عمودی و به سمت بالا روی محیط کشت قرار داده شدند رشد بهتر و بیشتری داشتند. در ژنوتیپ Z63 نتایج نشان داد که پلی‌وینیل پیرولیدون و فلوروگلوسینول موجب افزایش استقرار ریزنمونه‌ها و کاهش تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده گردیدند و علاوه بر آن باعث افزایش معنی‌دار در وزن تر و قطر کالوس نسبت به سایر تیمارها شدند. در ژنوتیپ Z60 سیستئین اثر معنی‌داری در افزایش استقرار ریزنمونه‌ها، کاهش تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده و افزایش وزن تر کالوس داشت.

واژه‌های کلیدی: **گردو، ریز ازدیادی، قهوه‌ای شدن.**

مقدمه

تکثیر برای گیاهانی نظیر گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) که روش‌های معمول ازدیاد در آنها کارایی و بازده لازم را ندارند، یکی از روش‌های مورد توجه تکثیر درون‌شیشه‌ای است. از مهمترین مراحل این روش مرحله استقرار و رشد ریزنمونه است. عوامل زیادی در این مرحله تأثیر دارند که می توان به زمان نمونه‌گیری، نوع ریزنمونه و جهت قرارگیری آن روی محیط کشت اشاره کرد. بافت‌های گردو غنی از ترکیبات پلی فنلی می‌باشند که پس از جدا شدن از پایه مادری به عنوان ریزنمونه، به لحاظ اکسیداسیون ترکیبات مذکور به رنگ تیره در آمده و ضمن انتشار به محیط کشت، ریزنمونه و استقرار آن را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند. برای غلبه بر این مشکل از روش‌های گوناگونی استفاده می شود که یکی از مهم‌ترین آنها استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. از نظر زمان تهیه ریزنمونه، دو گونه از اکالیپتوس شامل *Eucalyptus gunnii* و *E. viminalis* مورد مطالعه قرار گرفته اند که بهترین نتیجه مربوط به ریزنمونه‌هایی بوده که در فروردین ماه تهیه شده بودند و بالاترین درصد استقرار و کمترین میزان قهوه‌ای شدن را

* نویسنده مسئول: منصور غلامی تلفن: ۰۹۱۸-۸۱۳۱۲۰۶ E-mail: mgholami@basu.ac.ir

نشان دادند (Assareh & Zandi, 2006). Zabihi et al. (2008) در بررسی اثر نوع ریزنمونه در گیاه ملج (*Ulmus glabra*) گزارش نموده که جوانه‌های جانبی در خرداد ماه بهترین ریزنمونه از نظر رشد و استقرار بودند. در گزارش دیگری با استفاده از انواع ریزنمونه در ریزازدیادی اکالیپتوس *Eucalyptus gunnii*، جوانه‌های اپی‌کورمیک به عنوان بهترین ریزنمونه معرفی شده است (Assareh & Sardabi, 2004). جوانه‌های جانبی به عنوان بهترین ریزنمونه در ریز ازدیادی بلوط قرمز (*Quercus rubra*) معرفی شده که به خوبی امکان تولید گیاه کامل را فراهم نموده است (Puddeohat et al., 1997).

ریزنمونه‌ها را می‌توان روی محیط کشت به صورت افقی، عمودی یا مایل قرار داد که در هر روش حفظ قطبیت ریزنمونه ضروریست. در روش قرارگیری عمودی رشد ریشه‌ها عموماً راحت‌تر است و در این حالت تجمع مواد در قاعده فیزیولوژیکی ریزنمونه اتفاق می‌افتد. در مواردی که هدف باززایی شاخه است ریزنمونه باید به صورت افقی در محیط قرار داده شود (Hasandokht & Ebrahimi, 2006). اثر نوع ریزنمونه و جهت قرارگیری آن در محیط کشت در پرآوری شاخه‌های کروتون (*Codiaeum variegatum*) واریته پیکتوم[1] بررسی و گزارش شده که جوانه انتهایی مناسب‌ترین ریزنمونه برای تکثیر این گیاه است (Orlikowska et al., 2000). Vieitez et al. (1993) اثر جهت ریزنمونه را بر القای کالوس و رشد شاخساره در بلوط قرمز بررسی کردند. در آزمایش آنان ریزنمونه‌های تک گره که به صورت افقی قرار داشتند استقرار بهتری داشته و کالوس بیشتر و با وزن بالاتری تولید نمودند. Garcı´a-Luis et al. (2006) اثر جهت ریزنمونه در تماس با محیط کشت بر باززایی شاخه در ترویر سیترنج (دورگ بین پرتقال و نارنج سه برگ) را بررسی و عنوان کردند که ریزنمونه‌های تک گره که به صورت عمودی قرار گرفتند بیشترین وزن کالوس را تولید کردند و ریزنمونه‌های افقی و عمودی وارونه کمترین میزان وزن تر و اندازه را دارا بودند. Bhau & Wakhlu (2001) از برگ، قطعات تک گره و دمبرگ برای القای کالوس و باززایی در توت سفید (*Morus alba*) استفاده کردند و دریافتند که تک گره مناسب‌ترین ریزنمونه برای تکثیر این گیاه بود. Türemis & Çömlekçioglu (1996) در جستجوی مناسب‌ترین ریزنمونه برای ریز ازدیادی گردو، از سه نوع ریزنمونه شامل مریستم، انتهای شاخساره و جوانه‌های جانبی در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده کردند و انتهای شاخساره را بهترین ریزنمونه معرفی نمودند.

اثر تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌ها بر استقرار و باززائی گیاهان توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته و نتایج خوبی به دست آمده است. Emershad et al. (1989) تأثیر اسید آمینه‌های سیستئین و آسپاراژین بر استقرار ریزنمونه‌های تاک (*Vitis vinifera* L.) را مورد بررسی قرار دادند و سیستئین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر را مناسب ارزیابی کردند. Mahana & Motallebi-Azar (2007) ضمن بررسی اثر دو نوع آنتی‌اکسیدان شامل پلی وینیل پیرولیدین و اسید آمینه سیستئین هر یک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، دریافتند که حداکثر استقرار و حداقل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های سیب رقم گلدن دلیشس (*Malus X domestica*) در آنتی‌اکسیدان‌های مذکور حاصل شد. Nkanka (1982) نیز با کاربرد اسید آسکوربیک در کشت‌های درون شیشه‌ای اکالیپتوس (*Eucalyptus rudis*) و بلوط (*Quercus borealis*) موفق به استقرار ریزنمونه‌های آنها شد. Hohtola (1988) از پلی وینیل پیرولیدون در کشت‌های درون‌شیشه‌ای کاج *Pinus sylvestris* به منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها استفاده کرد. محققین دیگری نیز از اسید آسکوربیک، اسید سیتریک، پلی‌وینیل پیرولیدین و نیترات نقره برای کاهش قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه‌های گیاهان مختلف استفاده کرده اند که از آن جمله می‌توان به Wu & Toit (2004) روی گیاه (*Protea cynaroide*)، Shekafandeh & Khush-Khui (2007) روی گواوا (*Psiduim guajava*)، Titov et al. (2006) روی موز (*Musa spp*)، Hoque & Alima (2002) روی نوعی شاه بلوط (*Trapa japonica*)، Abdelwahed et al. (2008) روی باقلا (*Vicia faba*)، Moon-Kim et al. (2007) روی انجیر (*Ficus carica*)، Krishna et al. (2008) روی انبه

1. Pictum

(*Mangifera indica*) اشاره کرد. همچنین Lopez (2001) به طور موفقیت‌آمیزی از سیستئین برای کاهش قهوه‌ای شدن و استقرار ریزنمونه های گردو استفاده کرد. هدف از این تحقیق بررسی اثر زمان نمونه‌گیری، نوع و جهت قرار گیری ریزنمونه و همچنین نوع آنتی‌اکسیدان بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های دو ژنوتیپ گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

چهار آزمایش مجزا برای بررسی زمان نمونه‌گیری، نوع و نحوه قرارگیری ریزنمونه روی محیط کشت و نیز تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها روی رشد و استقرار ریزنمونه‌های دو ژنوتیپ Z60 وZ63 (دماوند)، طراحی و اجرا شد.

آزمایش اول: در این آزمایش اثر زمان نمونه‌گیری روی استقرار و رشد ریزنمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ریزنمونه‌ها در ماههای فروردین، اردیبهشت، خرداد، تیر و مرداد از دو ژنوتیپ Z60 و Z63 تهیه شدند. این نمونه ها از گره‌های حاوی جوانه رشد یافته از شاخه‌ها جدا گردیدند. ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ سپس ۱۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱/۵٪ ضدعفونی سطحی شدند و در پایان سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها روی محیط کشت DKW که محیط کشت تخصصی گردو است قرار گرفت (Vahdati et al., 2009). این محیط (pH ۵/۸±۰/۱) با ۸ گرم در لیتر آگار (دیفکو باکتو آگار) جامد شده و محتوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بود که برای کشت استفاده شد. تعداد ۶ ریزنمونه در هر ظرف کشت قرار داده شد و سپس آنها به اتاق رشد با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی منتقل گردیدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (هر یک با تعداد ۵ ریزنمونه) به صورت مجزا برای هر ژنوتیپ انجام گردید. در پایان آزمایش درصد استقرار و قهوه‌ای شدن ریزنمونه ها، قطر و وزن تر کالوس ثبت و مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش دوم: در این آزمایش استقرار و رشد چهار نوع ریزنمونه شامل مریستم انتهایی، تک گره، دمبرگ و برگ در دو ژنوتیپ Z60 وZ63 مورد بررسی قرار گرفت. مریستم انتهایی و تک گره برای شاخه‌زایی استفاده می‌شوند و در کالوس‌زایی علاوه بر آنها از برگ و دمبرگ نیز استفاده می شود که هر یک کالوس متفاوت با قابلیت باززایی مختلف تولید می‌کند. ریزنمونه‌ها در اواسط اردیبهشت ماه و از شاخه‌های سال جاری قبل از نیمه خشبی شدن گرفته شدند. نوع، ترکیبات، نحوه تهیه و شرایط نگهداری محیط کشت مشابه آزمایش اول بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار به صورت مجزا برای هر ژنوتیپ انجام گردید.

آزمایش سوم: در این آزمایش تأثیر نحوه قرارگیری ریزنمونه‌های دو ژنوتیپ Z60 و Z63 روی محیط کشت در سه حالت عمودی، عمودی وارونه و افقی بر استقرار و رشد آنها مورد بررسی قرار گرفت. در حالت عمودی، ریزنمونه طوری کشت گردید که قسمت تحتانی ریزنمونه به میزان ۱/۳ طول آن در داخل محیط کشت قرار گرفت. در جهت افقی ریزنمونه طوری کشت گردید که یک سانتی‌متر طول آن روی محیط قرار گرفت و جوانه آن به سمت بالا بود. حالت عمودی وارونه نیز عکس جهت عمودی بود. ریزنمونه‌ها شامل تک گره‌هایی به طول یک سانتی‌متر بودند که در اواسط اردیبهشت ماه از شاخه های سال جاری با قطر ۰/۵-۰/۷ سانتی‌متر قبل از نیمه خشبی شدن گرفته شده بودند و عیناً مشابه روش فوق ضدعفونی و به همان محیط کشت انتقال یافتند. آزمایش سوم نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار به صورت مجزا برای هر ژنوتیپ انجام گردید.

آزمایش چهارم: در این آزمایش قطعات شاخه‌های در حال رشد سال جاری، در اواسط اردیبهشت ماه از دو ژنوتیپ Z60 و Z63 و به قطر ۰/۵ تا ۰/۸ و طول ۰/۵ تا ۲ سانتی‌مترکه دارای جوانه بودند جدا و به عنوان ریزنمونه استفاده شدند. سپس ریزنمونه‌های جدا شده مشابه روش انجام شده در آزمایشات قبل ضدعفونی گردیدند. در نهایت تعداد ۵ ریزنمونه در هر ظرف کشت حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت قرار داده شدند. در این آزمایش مواد آنتی‌اکسیدان پس از اتوکلاو با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر به محیط‌های کشت اضافه شدند. شرایط اتاقک رشد برای نگهداری نمونه‌ها نیز مشابه آزمایشات قبل بود. این آزمایش به صورت مجزا برای هر ژنوتیپ به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گردید. فاکتور اول نوع

آنتی‌اکسیدان در ۶ سطح شامل اسید اسکوربیک، اسید سیتریک، اسید آمینه سیستئین، پلی وینیل پیرولیدون، آسپاراژین و فلوروگلوسینول و فاکتور دوم غلظت آنتی‌اکسیدان در سه سطح صفر (شاهد)، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در هر چهار آزمایش تجزیه و تحلیل داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS version 9,1 و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

زمان تهیه ریزنمونه

در هر دو ژنوتیپ Z60 و Z63 بالاترین میزان استقرار مربوط به ریزنمونه‌های تهیه شده در اردیبهشت ماه بود و ریزنمونه‌های مرداد ماه کمترین میزان استقرار را داشتند که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان دادند. ریزنمونه‌های اردیبهشت‌ماه بیشترین قطر و وزن تر کالوس را نیز دارا بودند که در این خصوص هم تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نمونه‌های تهیه شده در شروع فصل به دلیل فعال بودن بیشتر سلولها و بالا بودن سطح هورمون‌های درون‌زا در بافت‌ها بهترین پاسخ را به تیمارهای اعمال شده داده اند. در هر دو ژنوتیپ حداکثر قهوه‌ای شدن در ریزنمونه‌های مردادماه و کمترین میزان آن در ریزنمونه‌های اردیبهشت ماه مشاهده شد. با تغییر در فصل نمونه‌گیری از فروردین به مرداد و کاهش سرعت رشد و نمو، میزان استقرار، وزن تر و قطر کالوس حاصل روند کاهشی و درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها روند صعودی داشتند (جدول۱).

در ژنوتیپ Z63 وزن تر و قطر کالوس ریزنمونه‌های مردادماه نسبت به ژنوتیپ Z60 کمتر بود. Assareh & Zandi (2006) نیز ریزنمونه‌های تهیه شده در فروردین‌ماه را در اکالیپتوس بهترین ریزنمونه از لحاظ بیشترین درصد استقرار و کمترین میزان قهوه‌ای شدن معرفی کردند. Zabihi et al. (2008) نیز گزارش کرده‌اند که جوانه‌های جانبی گیاه ملج که در ابتدای فصل بهار استفاده می شوند بیشترین رشد و استقرار را نشان داده‌اند که با نتایج ما مطابقت داشت. اما Wadhwan & Malik (2009) با بررسی تأثیر زمان نمونه‌گیری در تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه دارویی *Tridax procumbents* نمونه‌های تهیه شده در خردادماه را دارای بیشترین رشد و استقرار معرفی کردند که با مشاهدات ما مغایر بود که احتمالاً به دلیل دیر باز شدن جوانه‌ها در این گیاه است که از لحاظ فیزیولوژیکی معادل ابتدای فصل رشد می‌باشد، هر چند از لحاظ زمان تقویمی متفاوت است.

نوع ریزنمونه

نتایج مربوط به تأثیر نوع ریزنمونه شش هفته پس از کشت نشان داد که در ژنوتیپ Z60 بالاترین میزان استقرار، وزن تر و قطر کالوس متعلق به مریستم انتهایی و تک گره بود، اما در ژنوتیپ Z63 فقط ریزنمونه‌های تک گره چنین اثری را نشان دادند که با نتایج بدست آمده از سایر ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت. این تفاوت بیانگر این واقعیت است که پاسخ ژنوتیپ‌ها و ارقام مختلف به تیمارهای یکسان در کشت بافت اغلب متفاوت است. در هر دو ژنوتیپ ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ حداکثر قهوه‌ای شدن را نشان دادند. ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و تک گره که دارای نقطه فعال رشد بودند حداکثر میزان رشد را به خود اختصاص دادند (جدول۲).

جدول ۱- اثر زمان نمونه‌گیری ریزنمونه دو ژنوتیپ Z60 و Z63 بر شاخص‌های رشد و استقرار آنها روی محیط کشت

زمان نمونه‌گیری	درصد قهوه‌ای شدن		وزن تر کالوس (گرم)		قطر کالوس (سانتی‌متر)		درصد استقرار	
	Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60
فروردین	۴۳c	۴۵d	۲/۸b	۲/۴b	۲/۹b	۲/۷b	۴۱b	۴۵b
اردیبهشت	۲۵d	۲۸e	۳/۲a	۳a	۳/۵a	۳/۴a	۸۵a	۶۲a
خرداد	۶۰b	۵۰c	۲/۷b	۲/۵b	۲/۷b	۲/۶b	۳۹c	۳۷c
تیر	۶۰b	۶۵b	۱/۹c	۱/۲c	۱/۷c	۱/۵c	۳۵c	۳۵c
مرداد	۸۸a	۸۵a	۰/۷d	۱/۴c	۰/۵d	۱/۲c	۱۰d	۱۰d

* حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲- اثر نوع ریزنمونه دو ژنوتیپ Z60 و Z63 گردو روی برخی شاخص‌های رشد و استقرار آنها روی محیط کشت

نوع ریزنمونه	درصد قهوه‌ای شدن		وزن تر کالوس (گرم)		قطر کالوس (سانتی‌متر)		درصد استقرار	
	Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60
مریستم انتهایی	۱۸c	۳۳b	۲/۳b	۲/۵a	۲/۵b	۲/۶a	۵۵b	۵۳a
تک گره	۲۰c	۳۱b	۲/۶a	۲/۵a	۲/۸a	۲/۵a	۶۶a	۵۵a
دمبرگ	۳۱b	۴۹a	۱/۵c	۲/۱b	۱/۷c	۲/۱b	۳۵c	۳۲b
برگ	۳۳a	۴۸a	۱/۵c	۲/۲b	۱/۷c	۲/۲b	۳۰c	۳۱b

* حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

این یافته‌ها با نتایج Türemis & Çömlekçioglu (1996) مطابقت دارد. آنها با بررسی سه نوع ریزنمونه در ریز ازدیادی گردو عنوان کردند که انتهای شاخساره و قلمه ۲/۵- ۲ سانتی‌متری با ۲-۱ جوانه جانبی درمقایسه با مریستم‌ها از لحاظ رشد و استقرار، ریزنمونه‌های مناسب تری بودند. Assareh & Sardabi (2004) از انواع ریزنمونه و آنتی‌اکسیدان‌ها در تولید انبوه ریزنمونه گونه جنگلی Eucalyptus gunnii استفاده کردند. در آزمایش آنان جوانه‌های اپی کورمیک کمترین میزان ترشح فنل را داشتند که اختلاف معنی‌داری با سایر ریزنمونه‌ها نشان دادند. Orlikowska et al. (2000) نیز در بررسی پرآوری شاخه‌های کروتون گزارش کردند که وزن تر و درصد استقرار ریزنمونه جوانه انتهایی بیش از بقیه بود و این یافته با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد. بررسی‌های این محققین نیز نشان داد که در گیاهان مختلف ریزنمونه‌هایی حداکثر استقرار را دارند که مواد غذایی جذب شده از محیط به یک نقطه رشد فعال منتقل شود. ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ به دلیل نداشتن نقطه فعال رشد و منبع جذب، رشد و استقرار کمتری داشتند. Puddeohat et al. (1997) در بلوط قرمز با استفاده از جوانه‌های جانبی (تک گره) موفق به استقرار و رشد ۸۵ درصد از ریزنمونه‌ها در محیط DKW شدند. Bhau & Wakhlu (2001) که از برگ، قطعات تک گره و دمبرگ برای القای کالوس و باززایی در توت سفید استفاده کردند، ریزنمونه‌های برگ را به دلیل استقرار بیشتر و تولید کالوس جنین زا برای باززایی گیاه مناسب‌تر دانستند.

وضعیت قرار گرفتن ریزنمونه‌ها

در هر دو ژنوتیپ Z60 و Z63 بالاترین میزان وزن تر و قطر کالوس و استقرار ریزنمونه و کمترین میزان قهوه‌ای شدن مربوط به ریزنمونه‌هایی بود که به صورت عمودی و به سمت بالا در محیط کشت قرار داده شدند. به دلیل قرارگیری ریزنمونه‌ها مشابه حالت قطبیت طبیعی در گیاه (از پائین به بالا) و مناسب بودن جهت آوندها در آنها، جذب مواد بهتر صورت گرفته و رشد بیشتر است. بنابراین تأثیر این نحوه کشت با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۳).

البته وجود نقطه فعال مریستم در جوانه جانبی نیز تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی رشد داشت. این نتایج با یافته‌های Garcı´a-Luis et al. (2006) که ریزنمونه‌های ترویرسیترنج (هیبرید بین پرتقال و پونسیروس) را در حالت عمودی کشت نمودند و بیشترین استقرار و وزن تر کالوس را بدست آوردند و همچنین Vieitez et al. (1993) که در کشت ریزنمونه های بلوط قرمز نتایج مشابهی را گزارش گردند مطابقت داشت. Ramarosandratana & Van Staden (2003) ریزنمونه‌های کاج کشت شده در حالت عمودی که واجد حداکثر رشد و کالوس جنین زا بودند را نسبت به سایر

جدول ۳- اثر نحوه قرارگیری ریزنمونه‌ها در محیط کشت بر روی برخی شاخص‌های رشد و استقرار آنها

موقعیت قرارگیری ریزنمونه	درصد قهوه‌ای شدن		وزن تر کالوس (گرم)		قطر کالوس (سانتی‌متر)		درصد استقرار	
	Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60
عمودی رو به بالا	۳۴c	۳۸c	۲/۸a	۲/۵a	۲/۴a	۲/۲a	۵۵a	۴۳a
عمودی وارونه	۴۶b	۵۱b	۱/۶c	۱/۴c	۱/۴c	۱/۳c	۳۴ c	۲۰c
افقی	۵۸a	۶۵a	۲/۲b	۲/۱b	۲b	۱/۸b	۴۲ b	۳۵b

* حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

حالت‌ها بهتر ارزیابی کردند و دلیل آن را جذب در مسیر انتقال طبیعی مواد در گیاه و وجود نقطه فعال رشد عنوان کردند. وقتی نمونه‌ها به صورت افقی کشت می‌شوند، فقط آن قسمت‌هایی از ریزنمونه که در ارتباط مستقیم با محیط کشت است در جذب مواد غذایی شرکت نموده و رشد می‌کنند. اگرچه مقداری از مواد مغذی نیز با حرکت افقی در آوندها باعث رشد جوانه میگردند، اما از آنجا که نوع جذب و انتقال مواد به صورت افقی در آوندها سرعت کمتری داشته و آوندها خود به دلیل قرار گرفتن عمودی در بافت ممکن است مانع جذب شوند، میزان رشد در ریزنمونه‌های افقی کمتر خواهد بود. در ریزنمونه‌های کشت شده با جهت وارونه کمترین شاخص‌های اندازه‌گیری شده به دست آمد که مانند حالت افقی فقط قسمت‌هایی از ریزنمونه که در تماس با محیط کشت بودند رشد کردند. در این آزمایش به احتمال قوی بر عکس بودن جهت آوندها مانع جذب و انتقال مناسب مواد غذایی در آنها شده است که با یافته‌های Garcı´a-Luis et al. (2006) و Orlikowska et al. (2000) مطابقت داشت.

نوع آنتی‌اکسیدان

شش هفته پس از کشت نتایج نشان داد که همه تیمارهای آنتی‌اکسیدان در مقایسه با شاهد باعث افزایش درصد استقرار، قطر و وزن تر کالوس شده و در برخی موارد باعث افزایش درصد قهوه‌ای شدن نیز گردیده‌اند. پلی‌وینیل پیرولیدون و فلوروگلوسینول به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در افزایش درصد استقرار ریزنمونه‌ها، کاهش تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده، وزن تر و قطر کالوس تولید شده در ژنوتیپ Z63 نسبت به اثر سایر تیمار تفاوت معنی‌داری داشت (جدول۴). در جدول زیر به دلیل مشابه بودن تیمار شاهد در هر شش آنتی‌اکسیدان یک بار در جدول آورده شده است.

این نتایج با یافته‌های Krishna et al. (2008) که عنوان نمودند اسید آسکوربیک و پلی‌وینیل پیرولیدون با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث رشد بهتر کالوس و اندام هوایی در انبه می گردد مطابقت داشت. Miri et al. (2003) در بررسی اثر جیبرلیک اسید و فلوروگلوسینول بر تکثیر درون‌شیشه‌ای پایه M9 سیب گزارش کردند که کاربرد فلوروگلوسینول به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث بهبود رشد و پرآوری در این پایه شده است. همچنین Mahana & Motallebi-Azar (2007) پلی‌وینیل پیرولیدون و سیستئین هر یک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر را که با کاهش قابل توجهی در قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و افزایش استقرار آنها همراه بود، بهترین آنتی‌اکسیدان‌ها در استقرار ریزنمونه‌های سیب 'گلدن دلیشس' معرفی نمودند. این نتایج نیز با یافته‌های گزارش حاضر که در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

جدول ۴- اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف بر شاخص‌های رشد و استقرار ریزنمونه در دو ژنوتیپ Z60 و Z63 گردوی ایرانی

نوع آنتی‌اکسیدان	غلظت mg/L	درصد قهوه‌ای شدن		وزن تر کالوس (گرم)		قطر کالوس (سانتی‌متر)		درصد استقرار	
		Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60	Z63	Z60
سیستئین	۱۰۰	۳۸b	۱۸c	۳/۵b	۴/۲a	۳/۲b	۳/۱b	۵۸b	۸۰a
	۲۰۰	۳۶b	۲۱c	۳/۳b	۴/۴a	۳/۳b	۳/۳b	۶۰b	۷۸a
اسیدسیتریک	۱۰۰	۳۷b	۲۸b	۳/۴b	۳/۵b	۳/۳b	۳/۲b	۶۲b	۶۷b
	۲۰۰	۳۵b	۲۶b	۳/۵b	۳/۴b	۳/۲b	۳/۳b	۶۰b	۶۵b
اسید آسکوربیک	۱۰۰	۳۱c	۲۷b	۳/۲b	۳/۴b	۳/۳b	۳/۲b	۶۶b	۶۲b
	۲۰۰	۳۲c	۲۹b	۳/۴b	۳/۵b	۳/۳b	۳/۱b	۶۸b	۶۵b
پلی وینیل	۱۰۰	۳۳c	۲۴c	۴/۳a	۳/۴b	۳/۷a	۳/۸a	۸۵a	۶۰b
پیرولیدین	۲۰۰	۳۲c	۲۲c	۴/۵a	۳/۶b	۳/۵a	۳/۸a	۸۸a	۶۲b
آسپاراژین	۱۰۰	۳۲c	۲۴c	۳/۵b	۳/۲b	۳/۲b	۳/۷a	۶۰b	۶۸b
	۲۰۰	۳۰c	۲۲c	۳/۳b	۳/۱b	۳b	۳/۶a	۶۲b	۶۸b
فلوروگلوسینول	۱۰۰	۳۰c	۲۳c	۴/۱a	۳/۳b	۳/۹a	۳/۱b	۸۵a	۶۵b
	۲۰۰	۳۳c	۲۳c	۴/۲a	۳/۴b	۴a	۳/۲b	۸۸a	۶۴b
شاهد	۰	۷۲a	۷۰a	۱/۵c	۱/۲c	۱/۱c	۰/۸c	۲۵c	۲۰c

* حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح ۵ درصد می‌باشد.

این دو آنتی‌اکسیدان نیز حداکثر استقرار را داشتند مطابقت داشت. در ژنوتیپ Z60 نتایج پس از شش هفته نشان داد که اسید آمینه سیستئین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اثر معنی‌داری بر درصد استقرار ریزنمونه‌ها و وزن تر کالوس داشت. اما تأثیر این تیمار در ژنوتیپ Z63 رشد کمتری به همراه داشت. این یافته‌ها با نتایج Lopez (2001) که با کاربرد سیستئین در گردو به نتایج مشابهی رسید، به جز در وزن تر کالوس مطابقت دارد. این تفاوت می تواند به دلیل اختلاف در ژنوتیپ‌های مورد آزمایش باشد، اما اثر آن روی قطر کالوس معنی‌دار نبود، در حالی که پلی‌وینیل پیرولیدون و آسپاراژین اثر مثبت و معنی‌داری در این خصوص داشتند. در ژنوتیپ Z63 بیشترین میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها (به جز شاهد) در تیمارهای سیستئین و اسید سیتریک مشاهده گردید، اما در ژنوتیپ Z60 تیمارهای اسید سیتریک و اسید اسکوربیک (به جز شاهد) بالاترین میزان قهوه‌ای شدن را داشتند که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان دادند. Hoque & Alima (2002) گزارش کردند که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک باعث رشد بیشتر کالوس شده و در وزن تر کالوس و در صد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های شاه بلوط دارای اثر معنی‌دار بوده است. Abdelwahed et al. (2008) نیز نشان دادند که اسید آسکوربیک به میزان ۱۰۰ و سیستئین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تأثیر مثبت و معنی‌داری در کاهش ترشح فنل و رشد ریزنمونه‌ها در گیاه باقلا داشته است که با نتایج تحقیق حاضر مغایر بود. این اختلاف احتمالاً از تفاوت در نوع گیاه مورد استفاده ناشی می‌شود. اما Wu & Toit (2004) گزارش کرده‌اند که در ریزنمونه‌های گیاه *Protea cynaroides*، اسید آسکوربیک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اثر مثبتی روی درصد بقای گیاهچه و میانگین رشد آنها داشته است. Shekafandeh & Khush-Khui (2007) عنوان نمودند که اسید آسکوربیک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تأثیر معنی‌داری بر ریزنمونه‌های سالم و درصد استقرار آنها در گیاه گواوا داشته است. که با مشاهدات ما در ژنوتیپ Z63 مطابقت می‌کند. Moon-Kim et al. (2007) اعلام کردند که در ریزنمونه‌های انجیر اسید سیتریک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده و رشد کالوس‌های جنین‌زا را کاهش داده است که دراین آزمایش نیز حداکثر قهوه‌ای شدن مربوط به این آنتی‌اکسیدان می‌باشد. Titov et al. (2004) گزارش نمودند که اسید سیتریک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در کاهش ترشح فنل و افزایش در صد استقرار ریزنمونه‌های موز تأثیر مثبتی داشته است. نتایج بررسی‌های مختلف نشان داده است که با توجه به جنس و گونه گیاهی مورد استفاده و میزان فنل موجود در ریزنمونه، نوع آنتی‌اکسیدان مؤثر و همچنین مقدار مصرف آن متفاوت است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در هر دو ژنوتیپ اثر پلی وینیل پیرولیدون بر قطر کالوس‌های تولید شده در مقایسه با تیمارهای اسید اسکوربیک، اسید سیتریک، سیستئین و آسپاراژین تفاوت معنی‌داری داشت. در کلیه شاخص‌های مورد بررسی بین دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید اما با شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. نتایج اخیر نشان می‌دهند که امکان بدست آوردن یافته‌های مشابه با کاربرد مقادیر کمتری از آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارد.

نتیجه‌گیری کلی

در کشت درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد آزمایش گردو، مریستم انتهایی و تک گره مناسب‌ترین ریزنمونه‌ها بودند. قرارگیری ریزنمونه‌ها در جهت عمودی بهتر از سایر تیمارها بود. ریزنمونه‌هایی که در ابتدای فصل رشد تهیه شده بودند احتمالاً به دلیل فعال بودن تقسیم سلولی و مقادیر بالاتر هورمون‌های درون زاد، رشد و استقرار بهتری داشتند. به جز عوامل مؤثر در رشد که بررسی گردید، تأثیر مواد آنتی‌اکسیدان بر استقرار و رشد ریزنمونه‌ها در مقایسه با شاهد بهتر بود، در عین حال که دو ژنوتیپ نیز متفاوت بودند و در بین آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده پلی‌وینیل پیرولیدون و سیستئین به طور نسبی نتیجه بهتری داشت.

REFERENCES

1. Abdelwahed, R., Hakam, N., Labhili, M. & Udupa, S. M. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 997-1002.
2. Assareh, M. H. & Zandi, E. (2006). Investigation of effective factors on exudation of phenols in tissue culture of *Eucalyptus gunnii* and *E. viminalis*. *Pajouhesh & Sazandegi*, 77, 184-190. (In Farsi).
3. Assareh, M. H. & Sardabi, H. (2004). Mass production of *Eucalyptus gunnii* plantlets under in vitro conditions. *Pajouhesh & Sazandegi*, 64, 22-29 (In Farsi).
4. Bhau, B. S. & Wakhlu, A. K. (2001). Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66, 25–29.
5. Emershad, R. L., Raminng, D. W. & Serpe, M. D. (1989). *In vitro* embryo development and plant formation from stenospermocarpic genotypes of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 15, 211-222.
6. Garcı´a-Luis, A., Molina, R. V., Varona,V., Castello, S. & Guardiola, J. L. (2006). The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration in vitro in epicotyl cuttings of Troyer citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 137–144.
7. Hasandokht, M. R. & Ebrahimi, R. (2006). *Principle of plant tissue culture*. Marze Danesh Publication. (In Farsi)
8. Hohtola, A. (1988). Seasonal change in explant viability and contamination of tissue culture from mature Scot pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 15, 211-222.
9. Hoque, A. & Alima, S. (2002). Overcoming phenolic accumulation during callus induction and in-vitro organogenesis in water chestnut *Trapa japonica*. *In Vitro Cell Development Biology*, 38, 342–346.
10. Krishna, H., Sairam, R. K., Singh, S. K., Patel, V. B., Sharma, R. R., Grover, M., Nain, L. & Sachder, A. (2008). Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia Horticulturae*, 118, 132–138.
11. Lopez, J. M. (2001). Field behavior of self rooted walnut tree of different cultivar produced by tissue culture and planted in Murica (Spain). *Acta Horticulturae*, 544, 543-546.
12. Mahana, N. & Motallebi-Azar, M. (2007). In vitro micropropagation of apple *Malus X domestica* cv. Golden *delicious*. *Applied Biology Science*, 72, 52-59.
13. Malik, C. P. & Wadhwan, Ch. (2009). Influence of explanting season on in vitro multiplication of the medicinal herb, *Tridax procumbens* L.. *African Journal of Biotechnology*, 8(14), 3239-3243.
14. Miri, S. M., Vaez Livari, B., Khalighi, A. & Ghaem Maghami, S. A. (2003). Effect of carbohydrate, gibberellic acid, indolebutyric acid, phloroglucinol, explant orientation and culture vessels volume on optimizing in vitro propagation of M.9 apple rootstock. *Paojouhesh & Sazandegi*, 59, 31-37. (In Farsi).
15. Moon-Kim, K., Young Kim, M., Young Yun, P., Chandrasekhar, T., Yoeon Lee, H. & Son-Sog, P. (2007). Production of multiple shoots and plant regeneration from leaf segments of fig tree (*Ficus carica* L.). *Journal of Plant Biology*, 50(4), 440-446.
16. Nkanka, B. (1982). Influence of vitamine C *in vitro* negative multiplication of *Euculyptus rudis* & *Quercus borealis*. *Plant Cell Report*, 8, 550-553.
17. Orlikowska, T., Sabaøa, I. & Kucharska, D. (2000). The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent. *Scientia Horticulturae*, 85, 103-111.
18. Puddeohat, I. J., Alderson, P. G. & Wright, N. A. (1997). Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 48(309), 951-962.
19. Ramarosandratana, A. V. & Van Staden, J. (2003). Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 249–255.
20. Shekafandeh, A. & Khush-Khui, M. (2007). Factors affecting in vitro establishnment of Guava (*Psiduim guajava*) expalnts. *Ameican-Eurasian Journal of Agriculture & Environment Science*, 2(6), 672-679.
21. Titov, S., Kumar Bhowmik, S., Mandal, A., Sadrul Alam, M. & Nasirodin, S. (2006). Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa spp*. cv. Kanthali floral bud explants. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2(3), 97-104.
22. Türemis, N. & Çömlekçioglu, N. (1996). Determination the most suitable explants for walnut micropropagation. *Acta Horticulturae*, 441, 127-135.
23. Vahdati, K., Rezaee, R. & Mirmasoomi, M. (2009). Micropropagation of some dwarf and early mature walnut genotypes. *Biotechnology*, 8(1), 171-175

24. Vieitez, A. M., Pintos, F., Sanjose, M. C. & Ballester, A. (1993). *In vitro* shoot proliferation on determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiology*, 12, 107-117.
25. Wu, H. C. & Toit, E. S. (2004). Reducing oxidative browning during in vitro establishment of *Protea cynaroides* .*Scientia Horticulturae*, 100, 355–358.
26. Zabihi, H., Hossini Nasr, S. M., Babaeyan Jelodar, N. & Jalilvand, H. (2008). Tissue culture of *Ulmus glabra* "Hudson": The effects of culture media, explants and their harvest Times. *Journal of Agriculture Science and Natural Resource*, 15(4), 44-52. (In Farsi).