فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد هیجدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ppt.2017.4467.1277

بررسی ترکیبات فنلی تراوش شده از ریزقلمه‌های تک‌گره گردو در محیط‌کشت مایع DKW

Investigation of Phenolic Compounds Exuded from Single Node Microcuttings of Walnut into Liquid Culture Medium DKW

عبداله احتشام‌نیا[۱] و منصور غلامی[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۱۴

چکیده

به‌منظور بررسی مقادیر برخی ترکیبات فنلی تراوش یافته از ریزقلمه‌های تک‌گره گردو به محیط‌کشت مایع (DKW) آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های خردشده با سه فاکتور شامل رقم در دو سطح (جمال و چندلر) و زمان تهیه ریزقلمه در چهار سطح (۱۵ و ۳۱ اردیبهشت، ۱۵ تیر و ۱۵ شهریورماه) و زمان ارزیابی محیط‌کشت مایع در سه سطح (۲۴،۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت) در سه تکرار انجام شد. هم‌چنین در آزمایشی مستقل، ترکیبات فنلی تراوش شده به محیط‌کشت مایع در ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت و ترکیب خالص ژوگلون به محیط‌کشت جامد اضافه شدند. نتایج نشان داد از لحاظ ۱۴ ترکیب فنلی در شاخساره و محیط‌کشت شامل الاژیک اسید، وانیلیک اسید، کوماریک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، جینتیسک اسید، فرولیک اسید، سیرینژیک اسید، سینامیک اسید، کاتچین، روتین و میریستین، ژوگلان و ۱و۴- نفتوکوئینون تفاوت معنی‌داری بین ارقام مشاهده نشد، امّا زمان تهیه ریزقلمه و زمان ارزیابی محیط‌کشت مایع تفاوت معنی‌داری نشان دادند. ترکیبات ژوگلان، الاژیک اسید، میریستین و وانیلیک اسید در مقادیر بالاتری نسبت به سایر ترکیبات فنلی در شاخساره سال جاری و ترکیبات ژوگلون، الاژیک اسید و میریستین بیش‌ترین تراوش را در محیط‌کشت مایع داشتند. اضافه کردن ترکیبات فنلی تراوش شده بعد از ۱۴۴ ساعت در محیط‌کشت جامد ضعیف‌ترین رشد و کم‌ترین میزان تغییر وزن ریزقلمه را ایجاد کرد که این کاهش اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت. به‌طورکلی، احتمالاً سه ترکیب ژوگلون، الاژیک اسید و میریستین از موانع اصلی در استقرار کاملاً موفق ریزقلمه‌های دو رقم جمال و چندلر هستند.

واژه‌های کلیدی: ژوگلون، جمال، چندلر، قهوه‌ای شدن

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
*: نویسنده مسئول Email: mgholami@basu.ac.ir

مقدمه

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.)، گسترده‌ترین پراکنش را در میان درختان خشکبار در جهان دارد. این گونه یکی از مهم‌ترین گونه‌های کشت‌وکار شده خانواده Juglandaceae می‌باشد (*مک گراناهان و لسلی*[1]، 1997). امروزه، با وجود اهمیت روزافزون تکثیر گردو از طریق ریزازدیادی و تحقیقات گسترده در این زمینه در ایران و جهان به‌عنوان ابزاری جهت ازدیاد سریع ژنوتیپ‌های برتر، توجه کمتری به بررسی فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تغییرات فصلی در این درخت برای رفع مشکلات موجود در ریزازدیادی آن از قبیل تراوش ترکیبات فنلی از سطح برش یافته ریزقلمه به محیط‌کشت، قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه و محیط‌کشت و درصد استقرار متغیر ریزقلمه در محیط کشت شده است. در شرایطی که همه نگاه‌ها و تحقیقات در ریزازدیادی گردو، اغلب به تغییر شرایط محیط کشت، استفاده از غلظت‌های متفاوت هورمون‌های مختلف و استفاده از ارقامی است که در شرایط محیط کشت بهتر استقرار می‌یابند، می‌توان با بررسی تغییرات محتوی فنل و پروفایل مواد فنلی در شاخساره سال جاری و ترکیبات تراوش شده به محیط کشت به اطلاعات مفیدی در این‌باره دست یافت. ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در اغلب بافت‌های گیاهی به مقدار زیادی وجود دارند (*تروتر*[2]، 2001؛ *رویچمن*[3] و همکاران، 2002). بیوسنتز آن‌ها وابسته به آنزیم‌های متعددی در مسیرهای متابولیکی مختلف است (*جی-آلماند*[4] و همکاران، 2001) و متابولیسم آن‌ها کاملاً در ارتباط با الگوهای تنظیمی بیوشیمیایی و مورفولوژیکی گیاهان است (*بارز*[5] و همکاران، 1985). مواد فنلی، با فرایندهای فیزیولوژیکی رشد و نمو درختان میوه مرتبط بوده و جنبه‌های مختلف زندگی میوه قبل و بعد از برداشت را تحت تأثیر قرار می‌دهند (*یوزنیک*[6] و همکاران، 2004). نفتوکوئینون‌ها و فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات فنلی اصلی گردوی ایرانی مطرح هستند (*جی-آلماند و دروت*[7]، 1989). در بین نفتوکوئینون‌ها، ژوگلان (۵-هیدروکسیل- ۱و۴ نفتوکوئینون) به‌دلیل واکنش‌پذیری شیمیایی آن، بیشتر توجه می‌شود. این ترکیب به‌طور بارز، متحمل واکنش‌های اکسیداسیون- احیاء برگشت‌پذیر با تشکیل مداوم رادیکال‌های آزاد می‌شود (*داروکس*[8] و همکاران، 1998).

1. McGranaham and Leslie
2. Treutter
3. Ruechmann
4. Jay-Allemand
5. Barz
6. Usenik
7. Jay-Allemandand Drouet
8. Duroux

ترکیب ژوگلان در برگ (*گیرزو*[9] و همکاران، 1998؛ *ویشل و آنتون*[10]، 1999؛ *آمارال*[11] و همکاران،2008)، پوست سبز میوه (*لی و کمپبل*[12]، 1969؛ *برازجانی*[13]، 1985؛ *رادیکس*[14] و همکاران، 1994 و 1998؛ *ماهونی*[15] و همکاران، 2000؛ *کولاریک*[16] و همکاران، 2005 و *استامپار*[17] و همکاران، 2006) و پوست داخلی ریشه (*هدین*[18] و همکاران، 1979) و در شاخه (*کلائودات*[19] و همکاران، 1997؛ *سولار*[20] و همکاران، 2006؛ چنیانی و همکاران، 2012) شناسایی شده است. در پژوهشی، ترکیبات فنلی در شاخه‌های یک‌ساله جوان‌سازی شده و بالغ درختان گردوی هیبرید موردبررسی قرار گرفت، نتایج این پژوهش نشان‌دهنده وجود دو ترکیب اصلی (A و B) بود که مقادیر این ترکیبات طی دوره رشد شاخه‌های جوان‌سازی شده و بالغ ارزیابی شدند. سطح ترکیب A(با ساختار نامعین) در اوایل رشد در شاخه‌های جوان‌سازی شده بالا بود و در انتهای دوره رشد سطح ترکیب B (فلاونول) در شاخه‌های بالغ بالاتر بود. گرچه نسبت A/B همیشه در شاخه‌های جوان‌سازی شده بالاتر از شاخه‌های بالغ بود (جی-آلماند و همکاران، 1989). در برگ‌های گردو اسیدهای هیدروکسی سینامیک مختلف (۳-کافئوکوئینیک، ۳-پی-کوماروئیل کوئینیک و ۴-پی-کوماروئیل کوئینیک) و فلاونوئیدهای (کوئرسیتین ۳- گالاکتوزید، کوئرسیتین ۳-آرابینوزید، کوئرسیتین۳-زایلوزید، کوئرسیتین۳-رامنوزید) توسط *آمارال* و همکاران (2004) و اسید کلروژنیک توسط *ویشل و آنتون* (1999) شناسایی شده است. *استامپار* و همکاران (2006) از پوست سبز گردو ۱۳ ترکیب فنلی شامل کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، سیناپیک اسید، گالیک اسید، الاژیک اسید، پروتوکاتچیوک اسید، سیرینژیک اسید، وانیلیک اسید، کاتچین، اپی کاتچین، میریستین و ژوگلان را شناسایی نمودند. در شاخساره‌های درخت گردو، وجود فلاونول میریستین و گلوکوزیدی از ژوگلان (هیدروژوگلان بتا-دی-گلوکو-پیرانوزید، HJG) توسط *کلائودات*[21]و همکاران (1997) و همچنین برخی از فلاونوئیدها

9. Girzu
10. Wichtland Anton
11. Amaral
12. Leeand Campbell
13. Borazjani
14. Radix
15. Mahoney
16. Colaric
17. Stampar
18. Hedin
19. Claudot
20. Solar
21. Claudot

(کاتچین و میریستین)،اسیدهای فنلی (وانیلیک، سیرینژیک، الاژیک و کلروژنیک اسید) و کوئینون‌ها (ژوگلون و ۱و۴ نفتوکوئینون) توسط *سولار* و همکاران (2006) ثابت شده است. *سولار* و همکاران (2006)تغییرات فصلی فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و کوئینون‌های انتخابی را در شاخساره‌های یک‌ساله گردو موردبررسی قرار دادند، نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت فنل‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، تاریخ نمونه‌گیری و اثر متقابل بین رقم و تاریخ نمونه‌گیری قرار می‌گیرد. هر گروه فنلی تحت تأثیر نوسانات فصلی وابسته به مرحله رشدی[1] شاخه قرار گرفت. کوئینون‌ها (ژوگلون و ۱و۴ نفتوکوئینون) در انتهای ماه می در حداقل مقدار خود بودند و سپس در نمونه‌گیری بین بهار و تابستان مقادیر آن‌ها افزایش یافت. ژوگلان با شدت رشد شاخه همبستگی منفی معنی‌داری داشت. در مطالعه *چنیانی* و همکاران (2012) به بررسی ترکیبات فنلی در شاخه‌های جانبی تکثیر شده (ریزقلمه) ارقام هاوارد، چندلر، کرمان، سانلند و Z_{63} و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در یک مرحله از رشد شاخه پرداختند. نتایج نشان داد که در همه ارقام موردبررسی ترکیبات کلروژنیک اسید، گالیک اسید، پی-کوماریک اسید، ژوگلان و کوئرستین وجود دارد و ترکیب سیرینژیک اسید و وانیلیک اسید تنها در رقم هاوارد مشاهده گردید. در ریزازدیادی گیاهان چوبی، زخم‌زنی اندام‌ها به‌منظور تهیه ریزنمونه، به مثابه یک تنش عمل می‌کند که می‌تواند بیوسنتز ترکیبات فنلی را تحریک نماید (*ویلسون و ون استادن*[2]، 1990؛ *دیکسون و پایوا*[3]، 1995؛ *دی‌کلرک*[4] و همکاران، 1999). تعدادی از محققان افزایش در محتوی مواد فنلی را در روزهای اول پس از استقرار قلمه‌های گیاهان مختلف گزارش نموده‌اند (*کابونی*[5] و همکاران، 1997؛ *نگ*[6] و همکاران، 2001؛ *فایوری رامپانت*[7] و همکاران، 2002؛ *کوادوری و آمسا*[8]، 2004). ریزنمونه‌های بعضی از گونه‌های گیاهی اغلب بعد از چند روز قرارگیری در محیط‌کشت، ضمن ترشح مواد تیره‌رنگ به درون محیط، قهوه‌ای رنگ می‌شوند و سپس رشد آن‌ها متوقف و بافت گیاهی از بین می‌رود. قهوه‌ای‌شدن بافت بیشتر در گونه‌هایی دیده می‌شود که حاوی مقدار زیادی تانن یا دیگر هیدروکسی‌فنول‌ها هستند (*احسان‌پور و امینی*[9]، 2001). در گردو، یکی از موانع اصلی در استقرار ریز نمونه‌های کشت شده وجود ترکیبات فنلی متعدد به‌ویژه ترکیب آللوشیمیایی ژوگلان است که با رشد سلول تداخل دارد (*ریئتول*[10]، 1982 و 1983). ترکیبات فنلی به‌عنوان سوبسترا برای برخی از اکسیدوردوکتازها از قبیل پلی فنل اکسیدازها (PPO) و پراکسیدازها (POD) هستند (*رابارد*[11] و همکاران، 1999). قهوه‌ای‌شدن محیط‌کشت به‌طور عمده نتیجه اکسیداسیون پلی‌فنل‌های تراوش شده از سطح برش‌یافته ریزنمونه‌ها است. میزان قهوه‌ای‌شدن مرتبط با میزان تخریب مواد فنلی است (*گاپی* و همکاران، 1995). *آموئیت*[12] و همکاران (1992) به بررسی ترکیبات فنلی و حساسیت به قهوه‌ای شدن ارقام مختلف سیب در مرحله بلوغ میوه پرداختند، آن‌ها دریافتند که تمام ترکیبات فنلی موردبررسی فرایند قهوه‌ای شدن را تحت تأثیر قرار می‌دهند، اما فلاونول‌ها و دی-هیدروچالکون‌ها (فلوریدزین) نسبت به اسید سینامیک و فلاونول‌ها کمتر تخریب می‌شوند. همبستگی قوی بین قهوه‌ای شدن و غلظت اسید کلروژنیک در سیب (*آموئیت* و همکاران، 1992)، هلو و شلیل (*چنگ و کریستو*[13]، 1995) و نارگیل (*جیانگ*[14] و همکاران، 1995) گزارش شده است. شاید به نوعی چالش اصلی در ریزازدیادی گردو را عدم‌شناسایی نوع و میزان ترکیبات فنلی در مراحل مختلف رشد شاخساره و سپس تراوش این ترکیبات به محیط‌کشت دانست. پژوهش حاضر با هدف بررسی موارد مذکور انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی موردنیاز این پژوهش طی چهار مرحله، از بخش‌های انتهایی محورهای شاخساره‌های سال جاری در ۱۵ و ۳۱ اردیبهشت، ۱۵ تیر و ۱۵ شهریورماه سال ۱۳۹۲ از درختان بالغ ارقام جمال[15]و چندلر[16] موجود در ایستگاه تحقیقات گردوی تویسرکان تهیّه شد. شرایط نگهداری درختان از هر نظر مشابه بود. ۴ درخت از هر رقم و ۴ شاخه جوان از هر درخت از ۴ جهت اصلی در هر تاریخ نمونه‌گیری از درختان قطع و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و سپس ریزقلمه‌ها به‌صورت تک گره[17] تهیه و ضدعفونی شده و در محیط‌کشت‌های مایع

1. ontogenetic
2. Wilsonand van Staden
3. Dixon and Paiva
4. De Klerk
5. Caboni
6. Nag
7. Faivre-Rampant
8. Quaddoury and Amssa
9. Ehsanpour and Amini
10. Rietvel
11. Robards
12. Amoit
13. Cheng and Cristove
14. Jiang
15. Jamal
16. Chandler
17. Single node

(DKW) و جامد (DKW) کشت شدند. لازم به ذکر است که محیط‌کشت DKW (*درایور* و *کانی‌یوکی*[1]، 1984)، پس از بهینه‌سازی (*مک گراناهان*[2] و همکاران، 1987)، مشخص شد که مناسب گونه‌های مختلف خانواده ژوگلانداسه از قبیل گردوی ایرانی است که در سال‌های اخیر به‌طور وسیعی به‌عنوان محیط‌کشت گردو به‌کار می‌رود.

ضدعفونی ریزقلمه

پس از تهیه ریزقلمه به‌صورت قطعات کوچک تک‌گره (طول ۳ تا ۵ سانتی‌متر)، ریزقلمه‌ها به‌مدت ۵±۲۰ در زیر آب جاری قرار داده شدند. پس از آن، به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول تازه هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد با دو قطره توئین ۲۰ قرار گرفته و نهایتاً ریزقلمه‌ها در زیر هود سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده و جهت کشت در محیط‌کشت آماده شدند.

شرایط کشت‌ها

ریزقلمه‌های تک‌گره در محیط‌کشت مایع (DKW) (*درایور* و *کانی‌یوکی*، 1984) حاوی عناصر ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها، و حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بدون آگار و مواد تنظیم‌کننده رشد و در محیط‌کشت جامد (DKW) به همراه ۸ گرم در لیتر آگار به‌عنوان محیط‌کشت پایه کشت شدند. pH محیط‌کشت با استفاده از سود ۰/۱ نرمال و کلریدریک اسید ۰/۱ نرمال قبل از اتوکلاو روی ۵/۷ تنظیم شد. سپس محیط‌کشت‌ها در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۳ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. تمام مراحل کشت زیر هود استریل و با استفاده از مواد و وسایل استریل انجام شد. کشت‌ها در شرایط مشابه در دمای ۲±۲۵ درجه و در یک دوره نوری ۱۶ ساعته با لامپ فلوروسنت سفید و کشت‌ها در محیط‌کشت مایع ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت روی شیکر (۲۰ دور در دقیقه) نگه داشته شدند.

ارزیابی ترکیبات فنلی شاخه سال جاری و محیط‌کشت مایع (DKW)

در مراحل مشخص شده، از شاخه‌های جمع‌آوری شده، قسمتی از بافت شاخه به‌طور جداگانه از نظر ترکیبات فنلی موردنظر با استفاده از دستگاه HPLC ارزیابی و هم‌چنین از این شاخه‌ها، ریزقلمه تک‌گره تهیه و در محیط‌کشت مایع (DKW) و در ارلن ۲۵cc که حاوی همین حجم محیط‌کشت مایع بود، روی پنبه استریل کشت شد و درب آن توسط فویل آلومینیومی کاملاً بسته شد، سپس محیط‌کشت‌ها ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت از نظر برخی ترکیبات فنلی موردنظر شامل (کلروژنیک اسید، الاژیک اسید، گالیک اسید، کاتچین و ژوگلان) با استفاده از دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفت.

استخراج و ارزیابی ترکیبات فنلی از محیط‌کشت مایع

بدین‌منظور در حجم مساوی از محیط‌کشت، متانول به‌همراه ۱٪ از ماده ۲و۶-دی ترت بوتیل-۴-متیل پنتیل اضافه و مخلوط و سپس از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به ستون از نوع Hypersil-5-BDS به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر متصل به دستگاه Unicam-Crystal-200 دو پمپی ساخت کشور انگلستان که به‌صورت فاز معکوس (RP) تنظیم شده است، تزریق گردید. دتکتور از نوع UV-Vis بود که در طول موج ۲۸۰ نانومتر تنظیم شده بود. درجه حرارت به‌صورت ثابت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. فاز متحرک به‌صورت گرادیان از دو محلول شامل محلول شماره یک حاوی آب مقطر با ۰/۵ درصد اسید استیک و محلول شماره دو حاوی استونیتریل و آب با نسبت مساوی که سرعت جریان فاز متحرکیک میلی‌لیتر در دقیقه بود. نوع و مقدار هر یک از مواد براساس زمان بازداری پیک خروجی و سطح زیر منحنی درمقایسه با پیک‌های استاندارد تعیین شد (*کاسمولسکو و ترندافایر*[3]، 2011).

استخراج و ارزیابی ترکیبات فنلی از بافت شاخساره سال‌جاری

۰/۵ گرم بافت گیاهی با ۲۰ میلی‌لیتر متانول خالص حاوی ۱٪ از ماده ۲و۶-دی ترت بوتیل-۴-متیل پنتیل به‌طور کامل مخلوط و سپس سانتریفوژ شد. مایع رویی[4] از فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. از این محلول به ستون HPLC با شرایط فوق تزریق شد. نوع و مقدار هر یک از مواد براساس زمان بازداری پیک خروجی و سطح زیر منحنی با مقایسه با پیک‌های استاندارد تعیین شد (*کاسمولسکو* و *ترندافایر*، 2011).

ارزیابی فنل کل در محیط‌کشت جامد

1. Driver and Kuniyuki
2. McGranahan
3. Cosmulescu and Trandafir
4. Supernatant

هم‌زمان با کشت در محیط‌کشت مایع در هر مرحله از رشد شاخه سال جاری، از شاخه‌های جمع‌آوری شده، ریزقلمه تک گره تهیه و در محیط‌کشت جامد (DKW) کشت شده و محتوی فنل کل در بافت شاخه با معرف Folin-Ciocalteu و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Cary 100 conc UV/Visible) انجام شد. ۳۰۰ میکرولیتر از این محلول را در لوله آزمایش ریخته، به آن ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ درصد و بعد از گذشت هشت دقیقه به آن ۱۲۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم هفت درصد اضافه شد. پس از ۱/۵ ساعت نگهداری در شرایط دمای اتاق و تاریکی، میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فنل کل از روی میزان جذب نمونه و مقایسه آن با استاندارد، بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در یک گرم بافت تازه بیان شد.

ارزیابی قهوه‌ای شدن ریزقلمه در محیط‌کشت جامد (DKW)

شاخص قهوه‌ای شدن ریزقلمه در محیط کشت جامد بر اساس روش *یانگ*[1] و همکاران (2010) ارزیابی شد:

$$\text{شاخص قهوه ای شدن} = \frac{\text{سطح قهوه ای شدن} \times \text{تعداد ریزقلمه با سطح قهوه ای شدن}}{\text{تعداد کل ریزقلمه ها}}$$

سطح قهوه‌ای شده ریزقلمه‌ها به‌وسیله اندازه‌گیری وسعت کل سطح قهوه‌ای شده در هر ریزقلمه و در ۵ مقیاس سنجیده شد. ۰= بدون علائم قهوه‌ای شدن، ۱= سطح قهوه‌ای شده کمتر از ۱۰ درصد، ۲= سطح قهوه‌ای شده ۲۵-۱۰ درصد، ۳= سطح قهوه‌ای شده ۵۰-۲۵ درصد، ۴= سطح قهوه‌ای شده بیشتر از ۵۰ درصد.

اضافه کردن ژوگلون و ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت مایع به محیط‌کشت پایه جامد(DKW)

به‌منظور بررسی تأثیر ژوگلون و ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت مایع در رشد ریزقلمه در محیط‌کشت پایه جامد، از ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت (در محیط‌کشت مایع) به همراه ژوگلون به‌عنوان عامل‌خارجی در مقایسه با تیمار شاهد به‌کار برده شد. ژوگلون در آب مقطر، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه روز (۲۴ ساعت) حل شد (*ارسیسلی*[2] و همکاران، 2005). هم‌چنین، محلول‌های محیط‌کشت مایع ابتدا از کاغذ صافی گذرانده و سپس در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. از سوپرناتانت آن‌ها برای این آزمایش استفاده گردید (*کوکاکالیسکن و ترزی*[3]، 2001). مقدار ۱٪ از هر محیط‌کشت مایع (۱۰ میلی‌لیتر در لیتر)، ژوگلون با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر (چنیانی، ۱۳۹۰) و در تیمار شاهد ۱۰ میلی‌لیتر در لیتر آب مقطر به محیط‌کشت اضافه شد. محیط‌کشت بعد از اضافه کردن محلول‌ها و ژوگلون اتوکلاو شد. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داده است که اثر ژوگلون در رشد، تحت تأثیر اتوکلاو کردن آن قرار نمی‌گیرد (*هجل*[4] و همکاران، 1993). در این آزمایش، تا حد امکان سعی شد ریزقلمه‌ها از نظر اندازه طولی و قطری مشابه باشند. سپس، کشت‌ها به اتاقک رشد[5] منتقل و در شرایط مشابه در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در یک دوره نوری ۱۶ ساعته با لامپ فلورسنت سفید قرار داده شدند.

برای اندازه‌گیری میزان رشد ریزقلمه‌ها، آن‌ها را در شرایط مشابه نمونه‌برداری کرده، در روزهای هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم (به‌صورت هفتگی) در شرایط کاملاً استریل به‌نحوی که هیچ‌گونه آلودگی ایجاد نگردد، توسط ترازو وزن شدند تا تغییرات وزن تر به‌عنوان شاخصی کمی برای بیان میزان رشد در این شرایط مورداستفاده قرار گیرد (چنیانی، ۱۳۹۰). معیارهای دیگر شامل طول شاخه[6] جدید، تعداد برگ و تعداد جوانه جانبی[7]نیز برای اندازه‌گیری میزان رشد ریزقلمه‌ها اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری

تجزیه و تحلیل محتوی ترکیبات فنلی موجود در زمان‌های مختلف ارزیابی محیط‌کشت مایع (۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت) در تیمارهای موردنظر به‌صورت آزمایش اندازه‌های تکرار شده[8] در چارچوب طرح بلوک‌های خرد شده[9] با ۳ فاکتور شامل رقم (فاکتور A) در دو سطح (جمال و چندلر) و زمان تهیه ریزقلمه (فاکتور B) در چهار سطح (۱۵ و ۳۱ اردیبهشت، ۱۵ تیر و ۱۵ شهریور ماه) و زمان ارزیابی محیط‌کشت مایع (فاکتور C) در سه سطح (۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت) در سه تکرار و هر تکرار ۳۰ ریزقلمه، تجزیه‌وتحلیل آزمایش

1. Yang

2. Ercisli
3. Kocacaliskan and Terzi
4. Hejl
5. Growth Chamber
6. Shoot Length
7. Lateral Bud
8. Repeated Measures
9. Split Block Design

دوم، اثر نمونه‌گیری طی چهار مرحله از رشد شاخساره سال‌جاری بر محتوی فنل کل محیط‌کشت، شاخص قهوه‌ای شدن و میزان استقرار ریزقلمه‌ها در محیط‌کشت جامد (DKW) به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور شامل رقم (فاکتور A) در دو سطح (جمال و چندلر) و زمان تهیه ریزقلمه (فاکتور B) در چهار سطح (۱۵ و ۳۱ اردیبهشت، ۱۵ تیر و ۱۵ شهریور ماه) در سه تکرار و هر تکرار ۳۰ ریزقلمه و تجزیه‌وتحلیل آزمایش سوم، اثر اضافه کردن ژوگلون و ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت مایع (DKW) ریزقلمه در رشد ریزقلمه در محیط‌کشت پایه جامد (DKW) به‌صورت آزمایش فاکتوریل با سه فاکتور شامل رقم (فاکتور A) در دو سطح (جمال و چندلر)، مواد اضافه شده به محیط‌کشت (فاکتور B) در پنج سطح (اضافه کردن ترکیبات فنلی تراوش شده در محیط‌کشت مایع پس از ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت، ژوگلون و شاهد)و تعداد روز پس از کشت (فاکتور C) در چهار سطح (روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از کشت) در سه تکرار و هر تکرار ۳۰ ریزقلمه انجام شد. هم‌چنین، مقایسه مستقل (متعامد[1]) گروهی محتوی ترکیبات فنلی خاص با یکدیگر با استفاده از ضرایب در شاخساره و محیط‌کشت، با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS رویه GLM و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات فنلی شناسایی شده در شاخساره‌های سال‌جاری و محیط‌کشت مایع با استفاده از HPLC

ارقام مورد بررسی از نظر ترکیبات فنلی شناسایی شده یک الگوی مشابهی را با استفاده از HPLC با حضور ۱۴ ترکیب فنلی در زمان‌های مختلف تهیه ریزقلمه شاخساره سال جاری ارقام (شکل ۱) و زمان‌های مختلف ارزیابی محیط‌کشت مایع در پانزدهم اردیبهشت، سی و یکم اردیبهشت، پانزدهم تیر و پانزدهم شهریورماه نشان دادند. کاتچین، روتین، میریستین (فلانوئیدها)، ژوگلان، ۱و۴ نفتوکوئینون (کوئینون‌ها)، الاژیک اسید، وانیلیک اسید، کوماریک اسید، کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، جینتیسیک اسید، سیرینژیک اسید و سینامیک اسید (اسیدهای فنلی) ترکیبات مهم موجود در نمونه‌های تجزیه شده بودند (*سولار و همکاران*، 2006). که در چهار مرحله رشد شاخه هشت ترکیب فنلی شامل ژوگلان، ۱و۴ نفتوکوئینون، میریستین، الاژیک اسید، سیرینژیک اسید، کلروژنیک اسید، وانیلیک اسید و کاتچین در شاخساره یک‌ساله ارقام ایلایت، فرانکوت، هارتلی و سامپیون گزارش کرده‌اند.

همان‌طورکه ذکر شد در پژوهش حاضر، علاوه‌بر هشت ترکیب فوق، شش ترکیب دیگر شامل روتین، کوماریک اسید، کافئیک اسید، جینتیسک اسید، فرولیک اسید و سینامیک اسید در شاخساره‌های سال‌جاری ارقام جمال و چندلر شناسایی گردید.

محتوی ترکیبات فنلی موجود در زمان‌های مختلف ارزیابی محیط‌کشت مایع (DKW)

نتایج تجزیه واریانس اندازه‌های تکرار شده[2] در چارچوب طرح بلوک‌های خرد شده ترکیبات فنلی موجود در شاخساره و محیط‌کشت دو رقم گردو نشان داد بین ارقام (فاکتور A) مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از لحاظ ترکیبات فنلی موردمطالعه وجود ندارد. هم‌چنین برهمکنش رقم با زمان تهیه ریزقلمه (A×B) و رقم با زمان ارزیابی محیط‌کشت مایع (A×C) تأثیر معنی‌داری بر محتوی ترکیبات فنلی مورد بررسی نداشت. از سوی دیگر، زمان تهیه ریزقلمه (فاکتور B) و زمان ارزیابی محیط‌کشت مایع (فاکتور C) و برهمکنش این دو فاکتور (B×C)، اثر معنی‌داری بر محتوی ترکیبات فنلی مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد داشت. به‌عبارت دیگر، از لحاظ ۱۴ ترکیبات فنلی مورد بررسی در شاخساره و محیط‌کشت بین ارقام تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما بین زمان‌های مختلف تهیه ریزقلمه (فاکتور B) و زمان‌های ارزیابی محیط‌کشت مایع (فاکتور C) تفاوت معنی‌داری مشاهده شد.

بررسی تأثیر مراحل مختلف تهیه ریزقلمه (فاکتور B) بر ترکیبات فنلی تراوش شده در محیط‌کشت نشان داد بین نمونه‌گیری در ۱۵ اردیبهشت با ۳۱ اردیبهشت اختلاف معنی‌داری در هیچ‌کدام از ترکیبات فنلی تراوش شده در محیط‌کشت مشاهده نشد. این نتیجه با نتایج مطالعات قبلی در خصوص تهیه ریزقلمه در اوایل فصل رشد مطابقت دارد (یاری و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که محدوده‌ی زمانی حدود یک ماهه‌ی ابتدای فصل رشد (اردیبهشت ماه)، با توجه به این‌که اغلب ترکیبات مورد بررسی در حداقل مقدار خود در محیط‌کشت تراوش می‌شوند، زمان مناسبی برای تهیه ریزقلمه است.

ارزیابی ترکیبات فنلی تراوش شده به محیط‌کشت (فاکتور C) در زمان‌های مختلف نشان داد از میان ۱۴ ترکیب فنلی شناسایی شده، مقدار ترکیبات ژوگلان، میریستین، الاژیک اسید و کلروژنیک اسید در داخل محیط‌کشت اختلاف معنی‌داری در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از کشت نداشتند. هم‌چنین، مقدار تراوش شده از شش ترکیب روتین، کاتچین،

1. Orthogonal

2. Split units in time

کافئیک اسید، جینتیسک اسید، فرولیک اسید و الاژیک اسید اختلاف معنی‌داری در ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت نشان نداد.

مقایسه مستقل (متعامد) گروهی ترکیبات فنلی خاص در شاخساره و محیط‌کشت

مقایسه مستقل گروهی مقدار ژوگلان (مقایسه ۱)، ۱و۴ نفتوکوئینون (مقایسه ۲)، میریستین (مقایسه ۳)، الاژیک اسید (مقایسه ۴)، فرولیک اسید (مقایسه ۵)، جنتیستیک اسید (مقایسه ۶)، کوماریک اسید (مقایسه ۷)، سیرینژیک اسید (مقایسه ۸)، کافئیک اسید (مقایسه ۹)، کلروژنیک اسید (مقایسه ۱۰)، وانیلیک اسید (مقایسه ۱۱)، کاتچین (مقایسه ۱۲)، روتین (مقایسه ۱۳) و سینامیک اسید (مقایسه ۱۴) با استفاده از ضرایب در شاخساره سال‌جاری و محیط‌کشت در زمان‌های مختلف پس از کشت در محیط‌کشت مایع (۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت) با دیگر ترکیبات فنلی (مقایسه یک ترکیب خاص با ۱۳ ترکیب دیگر در محیط‌کشت) در مراحل تهیه ریزقلمه دو رقم گردو نشان داد که زمان نمونه‌گیری از شاخساره و زمان ارزیابی محیط‌کشت تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر محتوی ترکیبات فنلی دارد (جدول ۱).

ترکیبات فنلی موجود در شاخساره سال‌جاری و محیط‌کشت

نتایج مقایسه ترکیبات فنلی موجود در شاخساره سال‌جاری (طی زمان‌های مختلف تهیه ریزقلمه) و ترکیبات فنلی تراوش شده به محیط‌کشت در ساعات مختلف (۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت) نشان داد که ترکیبات ژوگلان، میریستین، کافئیک اسید و وانیلیک اسید (مقایسه‌های ۱، ۳، ۹ و ۱۱) دارای اختلاف معنی‌داری با سایر ترکیبات در سطح یک درصد و ترکیبات الاژیک اسید، فرولیک اسید، کاتچین و سینامیک اسید (مقایسه‌های ۴، ۵، ۱۲ و ۱۴) با سایر ترکیبات اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد دارند و نهایتاً دیگر ترکیبات شامل ۱و۴ نفتوکوئینون، جنتیستیک اسید، کوماریک اسید، سیرینژیک اسید، کلروژنیک اسید و روتین (مقایسه‌های ۲، ۶، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۳) اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (جدول ۱). ترکیبات ژوگلان، الاژیک اسید، میریستین و وانیلیک اسید به‌ترتیب بیش‌ترین و ترکیبات کافئیک اسید، سینامیک اسید، فرولیک اسید و کاتچین به‌ترتیب کم‌ترین مقادیر را در شاخساره و محیط‌کشت در بین تمامی ترکیبات داشتند. گزارش شده است در گردوی ایرانی، نفتوکوئینون‌ها و فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات فنلی اصلی مطرح هستند (جی-*آلماند* و *دروت*، 1989) در این مطالعه نیز ترکیب ژوگلان به‌عنوان یک نفتوکوئینون و میریستین به‌عنوان یک فلاونوئید مقادیر بالایی نسبت به دیگر ترکیبات در ریز نمونه‌های تهیه شده از شاخساره‌های گردو داشت.

ترکیبات فنلی تراوش شده به محیط‌کشت مایع

نتایج بررسی مقایسه ترکیبات فنلی تراوش شده به محیط‌کشت مایع در ساعات مختلف پس از کشت (۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت) نشان داد که تنها محتوی ژوگلان تراوش شده به محیط‌کشت (مقایسه ۱) اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد با سایر ترکیبات دارد. ترکیبات میریستین، الاژیک اسید و کافئیک اسید تراوش شده به محیط‌کشت (مقایسه‌های ۳، ۴ و ۹) با سایر ترکیبات در محیط‌کشت اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد داشتند. دیگر ترکیبات تراوش شده به محیط‌کشت شامل ۱و۴ نفتوکوئینون، فرولیک اسید، جنتیستیک اسید، کوماریک اسید، سیرینژیک اسید، کلروژنیک اسید، وانیلیک اسید، کاتچین، روتین و سینامیک اسید اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۱). ترکیبات ژوگلان، الاژیک اسید و میریستین به‌ترتیب بیش‌ترین (شکل ۲) و ترکیب کافئیک اسید کم‌ترین مقدار تراوش شده به محیط‌کشت را در بین تمامی ترکیبات داشته است.

این نتایج نشان داد که ترکیب غالب تراوش شده در محیط‌کشت، ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت، ژوگلان می‌باشد، که با ۱۳ ترکیب دیگر اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دارد (شکل ۳). این نتیجه با گزارشات قبلی در خصوص وجود ژوگلان فراوان به‌عنوان مانع اصلی استقرار ریزقلمه‌های گردو (*ریئتول*، 1982 و 1983) مطابقت دارد. پس از ژوگلان، ترکیبات الاژیک اسید و میریستین در مقادیر بالایی در محیط‌کشت تراوش شده است (شکل ۲). سایر ترکیبات با وجود این‌که در این مطالعه در محیط‌کشت شناسایی شده‌اند، با هم اختلاف معنی‌داری ندارند. محققین مختلف نیز افزایش در محتوی مواد فنلی را در روزهای اولیه پس از استقرار قلمه‌های گیاهان مختلف گزارش نموده‌اند (*کابونی* و همکاران، 1997؛ *نگ* و همکاران، 2001؛ *فایوری رامپانت* و همکاران، 2002؛ *کوادوری* و *آمسا*، 2004) که با نتایج این تحقیق در افزایش تراوش ترکیبات فنلی در محیط‌کشت در روزهای اول پس از کشت ریزقلمه‌ها مطابقت دارد. شرایط محیط‌کشت بافت شرایط مناسبی برای محافظت سلول‌های گیاهی در برابر محیط اطراف آن‌ها نیست به همین دلیل سلول‌های گیاهی در روزهای

ابتدایی پس از قرارگیری در محیط‌کشت شروع به سنتز ترکیبات فنلی در محیط‌کشت (به‌عنوان یک مکانیسم مقابله با تنش) می‌کنند. ترکیبات فنلی در غلظت کم نقش آنتی‌اکسیدانی و در غلظت‌های بالا به‌عنوان سوبسترا برای واکنش‌های قهوه‌ای‌شدن اکسیداتیو عمل می‌کنند (*رابارد*ز و همکاران، 1999). با توجه به مقادیر بالای سه ترکیب فنلی ژوگلان، الاژیک اسید و میریستین تراوش شده در محیط‌کشت می‌توان آن‌ها را سوبستراهای اصلی قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه گردو در محیط‌کشت معرفی نمود.

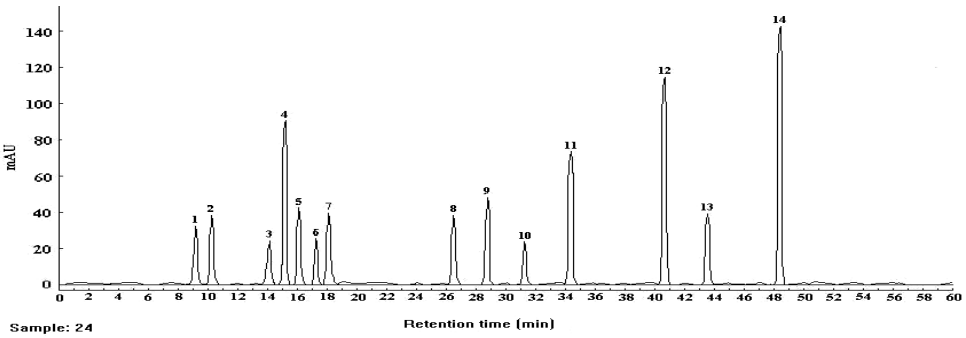
جدول ۱: مقایسه مستقل (متعامد) گروهی ترکیبات فنلی در شاخساره سال‌جاری و تراوش شده به محیط‌کشت دو رقم گردو با هم و به تفکیک

Table 1: Grouping orthogonal comparison of the phenolic compounds in current year shoots and exuded into the media of two walnut cultivars together and separtely

میانگین مربعات ۱۴ ترکیب فنلی Mean squares of 14 phenolic compounds			درجه آزادی df	منبع پراکنش Source of variations
شاخساره سال‌جاری Current year shoot	محیط‌کشت Media	شاخساره سال‌جاری و محیط‌کشت Current year shoot and media		
61.990^{HS}	0.459^{HS}	19.700^{HS}	13	زمان نمونه‌گیری از درخت و از محیط کشت (t) Time of sampling from tree and the media (t)
263.563^{HS}	1.431^{HS}	84.370^{HS}	1	مقایسه ۱ (ژوگلان) Comparison 1 (Juglone)
17.156^{NS}	0.073^{NS}	3.272^{NS}	1	مقایسه ۲ (۱و۴ نفتوکوئینون) Comparison 2 (1,4-Naphthoquinone)
260.713^{HS}	0.692^{S}	77.894^{HS}	1	مقایسه ۳ (میریستین) Comparison 3 (Myricetin)
22.788^{S}	0.977^{S}	10.711^{S}	1	مقایسه ۴ (الاژیک اسید) Comparison 4 (Ellagic acid)
42.540^{HS}	0.538^{NS}	14.969^{S}	1	مقایسه ۵ (فرولیک اسید) Comparison 5 (Ferulic acid)
17.096^{NS}	0.129^{NS}	5.522^{NS}	1	مقایسه ۶ (جنتیستیک اسید) Comparison 6 (Gentisic acid)
20.230^{S}	0.113^{NS}	6.307^{NS}	1	مقایسه ۷ (کوماریک اسید) Comparison 7 (Coumaric acid)
1.486^{NS}	0.112^{NS}	0.124^{NS}	1	مقایسه ۸ (سیرینژیک اسید) Comparison 8 (Syringic acid)
45.459^{HS}	0.993^{S}	17.695^{HS}	1	مقایسه ۹ (کافئیک اسید) Comparison 9 (Caffeic acid)
15.439^{NS}	0.204^{NS}	2.385^{NS}	1	مقایسه ۱۰ (کلروژنیک اسید) Comparison 10 (Chlorogenic acid)
84.714^{HS}	0.206^{NS}	22.785^{HS}	1	مقایسه ۱۱ (وانیلیک اسید) Comparison 11 (Vanillic acid)
38.162^{HS}	0.208^{NS}	11.945^{S}	1	مقایسه ۱۲ (کاتچین) Comparison 12 (Catechin)
20.131^{S}	0.443^{NS}	7.795^{NS}	1	مقایسه ۱۳ (روتین) Comparison 13 (Rutin)
17.882^{NS}	0.493^{NS}	10.056^{S}	1	مقایسه ۱۴ (سینامیک اسید) Comparison 14 (Cinnamic acid)
-	-	2.476	431	شاخساره سال‌جاری و محیط‌کشت Current year shoot and media
-	0.157	-	321	خطا (e) Error (e) محیط‌کشت Media
4.591	-	-	94	شاخساره سال‌جاری Current year shoot

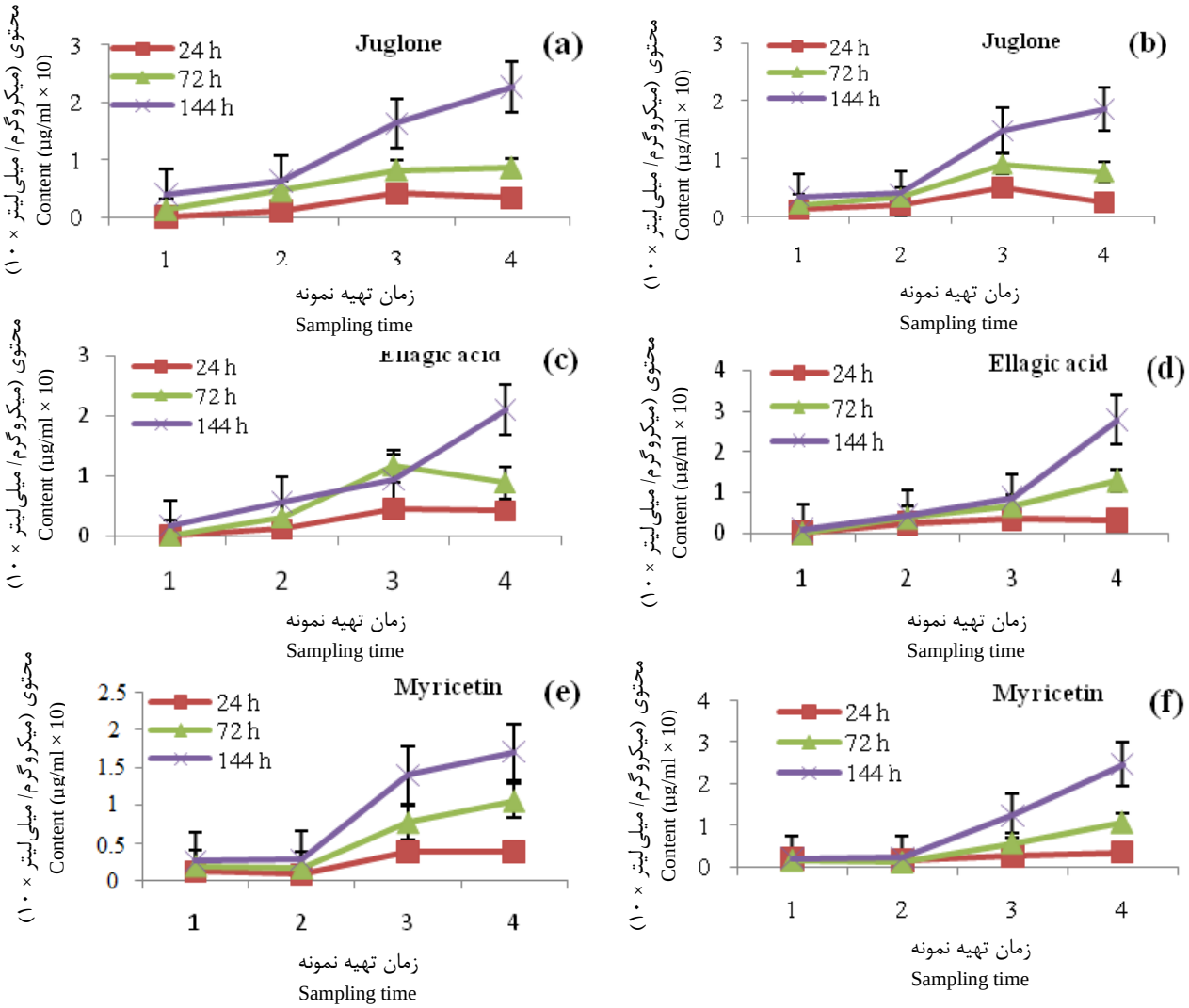
ns: غیرمعنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵، S: معنی‌دار (P < ۰/۰۵)، HS: بسیار معنی‌دار (P < ۰/۰۱)

ns: Not significantly different at 5%, S: Significantly different at 5%, HS: High significantly different at 1%



شکل ۱: کروماتوگرام HPLC ترکیبات فنلی شاخساره سال‌جاری رقم چندلر در زمان تهیه ریزقلمه در پانزدهم تیرماه. ترکیبات فنلی به‌ترتیب: ۱. سینامیک اسید، ۲. روتین، ۳. کاتچین، ۴. وانیلیک اسید، ۵. کلروژنیک اسید، ۶. کافئیک اسید، ۷. سیرینژیک اسید، ۸. کوماریک اسید، ۹. جنتیسیک اسید، ۱۰. فرولیک اسید، ۱۱. الاژیک اسید، ۱۲. میریستین، ۱۳. ۱ و۴ نفتوکوئینون و ۱۴. ژوگلان

Fig. 1: HPLC chromatogram of phenolic compounds of Chandler cultivar current year shoots on microcutting sampling time in 15 July. Phenolic compounds are: 1. Cinnamic acid, 2. Rutin, 3. Catechin, 4. Vanillic acid, 5. Chlorogenic acid, 6. Caffeic acid, 7. Syringic acid, 8. Coumaric acid, 9. Gentisic acid, 10. Ferulic acid, 11. Ellagic acid, 12. Myricetin, 13. 1,4-Naphthoquinone and 14. Juglone, respectively



شکل ۲: مقادیر ترکیبات فنلی (ژوگلان، الاژیک اسید و میریستین) تراوش شده، ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از قرارگیری در محیط‌کشت دو رقم چندلر (a, c, e) و جمال (b, d, f) در ۴ مرحله تهیه ریزقلمه: ۱) ۱۵ اردیبهشت، ۲) ۳۱ اردیبهشت، ۳) ۱۵ تیر و ۴) ۱۵ شهریورماه

Fig. 2: Amounts of phenolic compounds (Juglone, Ellagic acid and Myricetin) exuded 24, 72 and 144 h after culturing in two basal media of two Chandler (a, c, e) and Jamal (b, d, f) cultivars at 4 stages of microcutting sampling time: 1) 5 May, 2) 21 May, 3) 5 July and 4) 5 September

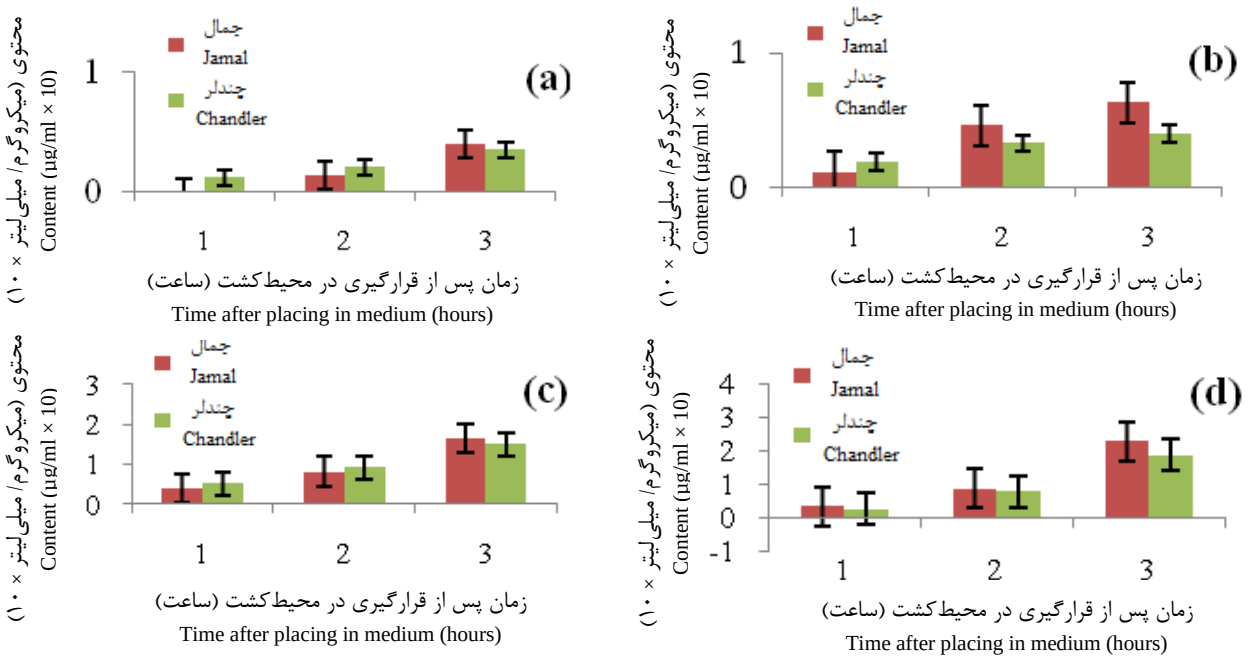
روند افزایش ترکیبات مختلف فنلی در محیط‌کشت تا ۱۴۴ ساعت پس از کشت ادامه داشت که می‌توان با یک یا چند واکشت این مقدار را از محیط‌کشت حذف نمود. البته استفاده از پلی‌وینیل‌پیرولیدون[1] (PVP)، ذغال فعال[2] و مواد آنتی‌اکسیدان[3] نیز راهکار مناسبی برای حذف، بلوکه کردن یا غیرفعال کردن این ترکیب در محیط‌کشت می‌تواند باشد (*چاوان*[4] و همکاران، 2000؛ *هوآنگ*[5] و همکاران، 2002؛ *تابایه*[6] و همکاران، 2006؛ *تئیگزریا*[7]، 1994؛ *دابرانسکی*[8] و همکاران، 2000a, b, c).

ترکیبات فنلی موجود در شاخساره سال‌جاری

نتایج بررسی مقایسه ترکیبات فنلی موجود در شاخساره طی زمان‌های مختلف نمونه‌گیری نشان داد که محتوی ژوگلان، میریستین، فرولیک اسید، کافئیک اسید، وانیلیک اسید و کاتچین (مقایسه‌های ۱، ۳، ۵، ۹، ۱۱ و ۱۲) اختلاف معنی‌داری با سایر ترکیبات در سطح یک درصد داشته است (جدول ۲). ترکیبات الاژیک اسید، کوماریک اسید و روتین با سایر ترکیبات (مقایسه‌های ۴، ۷ و ۱۳) اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد داشت. دیگر ترکیبات شامل ۱و۴ نفتوکوئینون، جنتیستیک اسید، سیرینژیک اسید، کلروژنیک اسید و سینامیک اسید اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. ترکیبات ژوگلان، الاژیک اسید، میریستین و وانیلیک اسید به‌ترتیب بیش‌ترین (شکل ۴) و ترکیبات کافئیک اسید، فرولیک اسید، روتین، کاتچین و کوماریک اسید به‌ترتیب کم‌ترین مقدار را در شاخساره در بین تمامی ترکیبات داشته‌اند. در مطالعه چنیانی و همکاران (۱۳۹۰) تغییرات ترکیبات فنلی در شاخه‌های جانبی تکثیر شده (ریزقلمه) پنج رقم گردو در یک مرحله از رشد شاخه نشان داد که در همه ارقام موردبررسی ترکیبات کلروژنیک اسید، گالیک اسید، پی-کوماریک اسید، ژوگلان و کوئرستین وجود دارد و ترکیب سیرینژیک اسید و وانیلیک اسید تنها در رقم هاوارد مشاهده گردید. نتایج این تحقیق در چهار ترکیب کلروژنیک اسید، ژوگلان، سیرینژیک اسید و وانیلیک اسید مشابه پژوهش حاضر بود. *سولار* و همکاران (2006) گزارش کرده‌اند که تغییرات ترکیبات فنلی در شاخه‌های یک‌ساله ارقام مورد بررسی در چهار مرحله نمونه‌گیری در فصل رشد شاخه بدین صورت بود که میریستین در سه نمونه‌گیری اول مقدار یکسانی داشت و در نمونه‌گیری چهارم مقدار آن افزایش یافت. مقادیر کاتچین و ۱و۴ نفتوکوئینون در نمونه‌گیری اول تا چهارم روند افزایشی داشت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. نتایج نشان می‌دهد که مقادیر ژوگلان در مراحل اول تا سوم افزایش و در مرحله چهارم کاهش یافت. وانیلیک اسید و کلروژنیک اسید در اولین نمونه‌گیری بالاترین مقدار و در آخرین نمونه‌گیری کم‌ترین مقدار را داشتند. مقادیر الاژیک اسید در اولین و دومین تاریخ نمونه‌گیری افزایش و در سومین و چهارمین نمونه‌گیری کاهش یافت. سیرینژیک اسید در اولین نمونه‌گیری کم‌ترین مقدار و و در سه نمونه‌گیری بعدی مقدار یکسانی داشت. به‌طورکلی، در گزارش *سولار* و همکاران (2006) فلاونوئیدها روند صعودی، اسیدهای فنلی روند نزولی و کوئینون‌ها روند صعودی تا نمونه‌گیری سوم و در نمونه‌گیری چهارم کاهش نشان داده‌اند. نتایج اندازه‌گیری‌ها در پژوهش حاضر نشان داد که فلاونوئیدها، نیز روند صعودی داشتند اما اسیدهای فنلی (۹ ترکیب) در دو رقم موردبررسی روند مشخصی نداشتند و در بیشتر ترکیبات مقادیر آن‌ها در مرحله سوم نمونه‌گیری بالاتر از دیگر مراحل نمونه‌گیری بود. کوئینون‌ها نیز روند تقریباً صعودی را طی چهار مرحله نمونه‌گیری داشتند. در گونه‌های آجیلی[9] مختلف نیز تغییرات فصلی در محتوی مواد فنلی به‌طور متعدد گزارش شده است. *هدین* و همکاران (1979) و *لانقنس* و همکاران (1978) نشان دادند که محتوی ژوگلان در ابتدای فصل رشد در پکان (*Carya illinoensis* K.) پایین و در جولای افزایش یافت که با نتایج این تحقیق در مورد افزایش مقدار ژوگلان در انتهای فصل نسبت به ابتدای فصل رشد مطابقت دارد. در گردوی سیاه (*Juglans nigra* L.) انباشتگی فصلی بزرگی در ژوگلان و گلیکوزید هیدروژوگلان (HJG) توسط *کلین و نیلی* (1984) گزارش شده است. به‌طوری‌که سطوح ژوگلان دو هفته بعد از شکوفایی در حداقل مقدار بوده است. زمانی‌که برگ‌ها از نظر انتوژنتیکی کاملاً بالغ شده بودند، سطوح ژوگلان به پیک خود در شروع ژوئن رسیده بود و سپس یک افزایش ناچیز در شروع جولای قبل از کاهش در انتهای فصل رشد رخ داده است. *گوئلدنیر*[10] و همکاران (1994) در برگ‌ها و جوانه‌های پکان، گلوکوزید ژوگلان را در سراسر فصل شناسایی کردند. براساس گزارش *کلائودت* و همکاران (1992) مقدار کل گلوکوزید هیدروژوگلان (HJG) و میریستین در شاخه‌های گردو ۱/۴ برابر طی فصل رشد چه در شاخه‌های نرک یا شاخه‌های بالغ افزایش

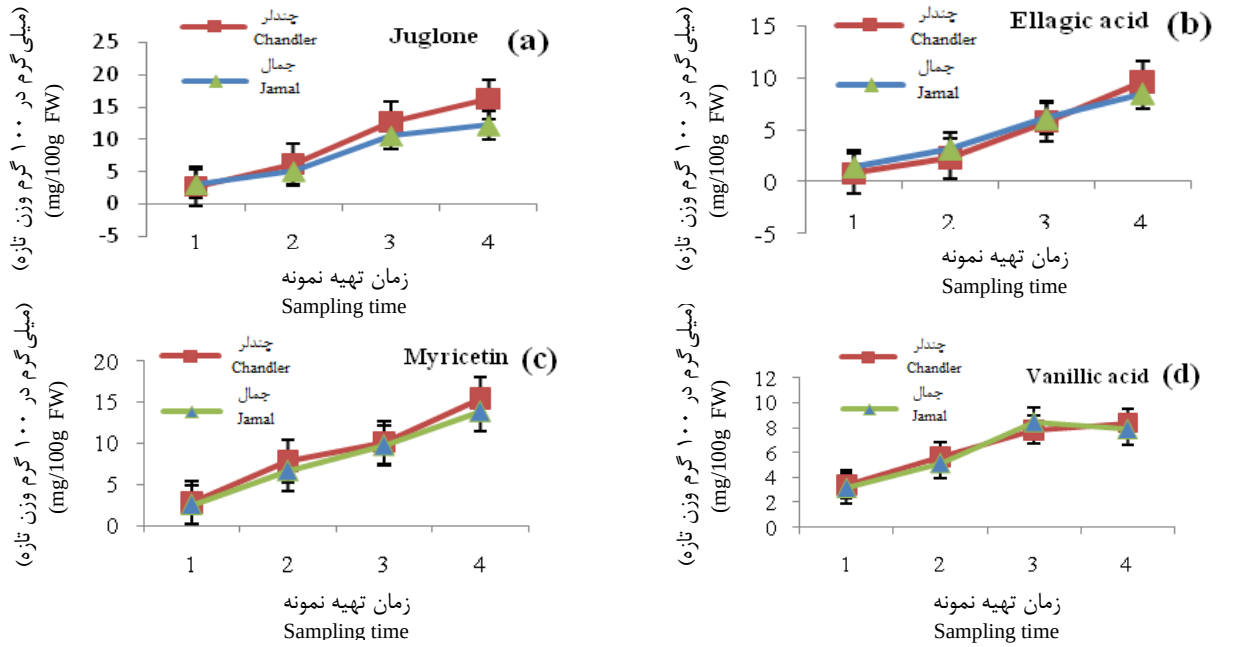
1. Polyvinyl pyrrolidone
2. Activated charcoal
3. Antioxidant agents
4. Chavan
5. Huang
6. Tabiyeh
7. Teixeria
8. Dobránszki
9. Nut
10. Gueldner

یافت. *آمارال* و همکاران (2004) مواد فنلی و فلاونوئیدی را از می تا سپتامبر در برگ‌های خشک شده گردو بررسی نمودند و بالاترین مقادیر در ژوئن و سپتامبر مشاهده گردید. همان‌طورکه ذکر گردید، در اغلب گزارشات (*گوئلدنیر* و همکاران، 1994؛ *کلائودت* و همکاران، 1992؛ *آمارال* و همکاران، 2004؛ *سولار* و همکاران، 2006) ترکیب ژوگلان یک روند صعودی را از ابتدای فصل رشد تا انتهای فصل رشد در شاخه دارد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۳: مقایسه مقادیر ژوگلان تراوش شده، ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از قرارگیری در محیط‌کشت ارقام چندلر و جمال در ۴ مرحله تهیه ریزقلمه: a) ۱۵ اردیبهشت، b) ۳۱ اردیبهشت، c) ۱۵ تیر و d) ۱۵ شهریورماه

Fig. 3: Comparison of the amounts of exuded Juglone 24, 72 and 144 h after culturing in two basal media Jamal and Chandler cultivars at 4 stages of microcutting sampling time: a) 5 May, b) 21 May, c) 5 July and d) 5 September



شکل ۴: مقادیر ترکیبات فنلی ژوگلان (a)، الاژیک اسید (b)، میریستین (c) و وانیلیک اسید (d) ارقام چندلر و جمال در ۴ مرحله رشد شاخساره سال‌جاری: ۱) ۱۵ اردیبهشت، ۲) ۳۱ اردیبهشت، ۳) ۱۵ تیر و ۴) ۱۵ شهریورماه

Fig. 4: Amounts of phenolic compounds a) Juglone, b) Ellagic acid, c) Myricetin and d) Vanillic acid in two Jamal and Chandler cultivars at 4 stages of current year shoot growth: 1) 5 May, 2) 21 May, 3) 5 July and 4) 5 September

آزمایش دوم: اثر نمونه‌گیری طی چهار مرحله از رشد شاخساره سال‌جاری بر محتوی فنل کل محیط‌کشت، شاخص قهوه‌ای‌شدن و میزان استقرار ریزقلمه‌ها در محیط‌کشت جامد (DKW)

هم‌زمان با کشت در محیط مایع در چهار مرحله نمونه‌گیری از شاخساره سال‌جاری (اواسط و اواخر اردیبهشت، تیر و شهریور ماه)، از شاخساره‌های جمع‌آوری شده، ریزقلمه تک‌گره تهیه و در محیط‌کشت جامد (DKW)کشت شده و محتوی فنل کل محیط‌کشت، شاخص قهوه‌ای‌شدن و میزان استقرار ریزقلمه‌ها ۳۰ روز پس از کشت ارزیابی گردید. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رقم و اثر متقابل رقم و زمان تهیه ریزقلمه تأثیر معنی‌داری بر محتوی فنل کل محیط‌کشت، قهوه‌ای شدن و میزان استقرار ریزقلمه‌ها ۳۰ روز پس از کشت ندارد و در مقابل، زمان‌های تهیه ریزقلمه (فاکتور B) تأثیر بسیار معنی‌داری بر محتوی فنل کل محیط‌کشت، قهوه‌ای شدن و میزان استقرار ریزقلمه‌ها داشت. شاید به‌دلیل تعداد کم رقم موردبررسی در این مطالعه باشد که اختلاف بین ارقام به‌خوبی مشخص نشده است. در مطالعه *سولار* و همکاران (2006) که چهار رقم موردبررسی قرار گرفته شد و مطالعه *چنیانی* و همکاران (2012) که پنج رقم بررسی شد، اختلاف بین ارقام از لحاظ ترکیبات فنلی شاخه یک‌ساله معنی‌دار گزارش شده است. در زمان تهیه ریزقلمه در ابتدای فصل رشد (اواسط و اواخر اردیبهشت‌ماه)، محتوی فنل کل در محیط‌کشت جامد در حداقل مقدار خود قرار داشت و ریزقلمه‌ها در همین زمان کم‌ترین شاخص قهوه‌ای‌شدن و بالاترین میزان استقرار را در محیط‌کشت داشتند که با نتایج مطالعات قبلی در خصوص زمان تهیه ریزقلمه در اوایل فصل رشد (یاری و همکاران، ۱۳۹۰) مطابقت دارد. از طرف دیگر بالاترین محتوی فنل کل در محیط‌کشت و شاخص قهوه‌ای‌شدن و کم‌ترین میزان استقرار ریزقلمه در زمان تهیه ریزقلمه در شهریورماه مشاهده شد (شکل ۵). گزارش شده است که تغییرات فصلی بر روی پدیده قهوه‌ای شدن در محیط‌کشت تأثیرگذار است (*بیئدرمن*، 1987؛ *وانگ* و همکاران، 1994). میزان قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه در محیط‌کشت تحت تأثیر زمان تهیه ریزقلمه و مرتبط با محتوی فنلی ریزقلمه قرار می‌گیرد که البته محتوی فنل و فلاونوئید کل تحت تأثیر پارامترهای اکولوژیکی سال موردبررسی و ژنوتیپ نیز می‌باشد (*جاکوپیک*[1] و همکاران، 2007؛ *کاسمولسکو*[2] و همکاران، 2010؛ *دابرانسکی و تکزیئرا داسیلوا*[3]، 2010).

همان‌طورکه در بخش قبلی و بررسی ترکیبات فنلی در محیط‌کشت مایع نیز مشخص شد، زمان تهیه ریزقلمه تأثیر بسیار معنی‌داری بر مقادیر ترکیبات فنلی در زمان‌های مختلف ارزیابی محیط‌کشت مایع داشت اما رقم تأثیر معنی‌داری بر مقادیر ترکیبات فنلی نداشت. بررسی نتایج این دو آزمایش با هم نشان‌دهنده این مطلب است که هم در محیط‌کشت جامد و هم محیط‌کشت مایع، زمان تهیه ریزقلمه از اهمیت بالایی از نظر تراوش ترکیبات فنلی به محیط‌کشت و سپس شاخص قهوه‌ای‌شدن و در نهایت استقرار ریزقلمه‌ها دارد. تراوش ترکیبات فنلی به محیط‌کشت (مایع و جامد) در ابتدای فصل و در اولین و دومین نمونه‌گیری در اردیبهشت‌ماه در حداقل مقدار خود بود و به این علت، کم‌ترین شاخص قهوه‌ای‌شدن و استقرار بالای ریزقلمه‌ها در این تاریخ نمونه‌گیری مشاهده شد و از طرف دیگر در شهریورماه میزان تراوش ترکیبات فنلی مختلف به محیط‌کشت (مایع و جامد) افزایش چشم‌گیری نسبت به ابتدای فصل رشد پیدا کرده و همین مسئله سبب افزایش شاخص قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه و نهایتاً سبب کاهش استقرار ریزقلمه‌ها گردید.

آزمایش سوم: اثر اضافه کردن ژوگلون و ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت مایع ریزقلمه در رشد ریزقلمه در محیط‌کشت پایه جامد (DKW)

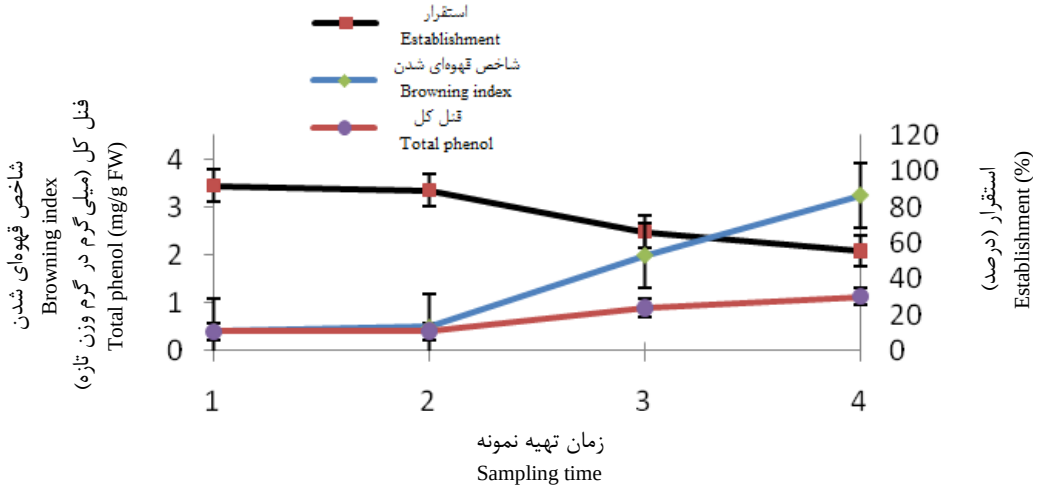
نتایج تجزیه واریانس مربوط به رشد ریزقلمه‌های ارقام جمال و چندلر در محیط‌کشت‌های حاوی ژوگلون و ترکیبات فنلی تراوش شده بعد از ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ساعت در محیط‌کشت نشان داد که ارقام از نظر وزن تر و طول نوشاخه اختلاف معنی‌داری ندارند ولی این دو صفت تحت تأثیر مواد اضافه شده به محیط‌کشت و زمان‌های مختلف ارزیابی محیط‌کشت (هفتگی) قرار گرفته است و اثرات آن‌ها به تنهایی در هر دو صفت مذکور و اثرات متقابل آن‌ها با هم و با رقم در صفت وزن‌تر اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دارد. رقم، مواد اضافه شده به محیط‌کشت و زمان‌های مختلف ارزیابی محیط‌کشت (هفتگی) اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد از نظر تعداد جوانه جانبی و شاخص قهوه‌ای شدن دارند ولی تنها اثر متقابل مواد اضافه شده به محیط‌کشت و زمان‌های مختلف ارزیابی

1. Jakopic

2. Cosmulescu

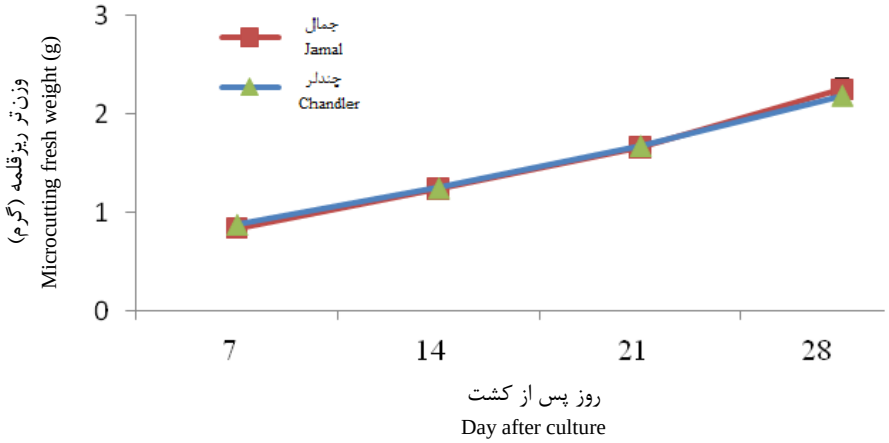
3. Dobránszkiand Teixeira da Silva

محیط‌کشت (هفتگی) اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد از نظر تعداد جوانه جانبی دارد.



شکل ۵: تأثیر زمان تهیه ریزقلمه بر محتوی فنل کل محیط‌کشت، قهوه‌ای‌شدن و میزان استقرار ریزقلمه‌ها ۳۰ روز پس از کشت در محیط‌کشت جامد دو رقم جمال و چندلر در ۴ مرحله رشد شاخساره سال‌جاری: ۱) ۱۵ اردیبهشت، ۲) ۳۱ اردیبهشت، ۳) ۱۵ تیر و ۴) ۱۵ شهریورماه

Fig. 5: Effect of sampling time on total phenol content of media, browning and microcutting establishment rate 30 days after culturing on solid media of two Jamal and Chandler cultivars at 4 stages of current year shoots growth: 1) 5 May, 2) 21 May, 3) 5 July and 4) 5 September



شکل ۶: مقایسه تغییرات وزن تر ریزقلمه‌های ارقام جمال و چندلر در محیط‌کشت پایه محتوی ژوگلون و دیگر ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت مایع بعد از ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت

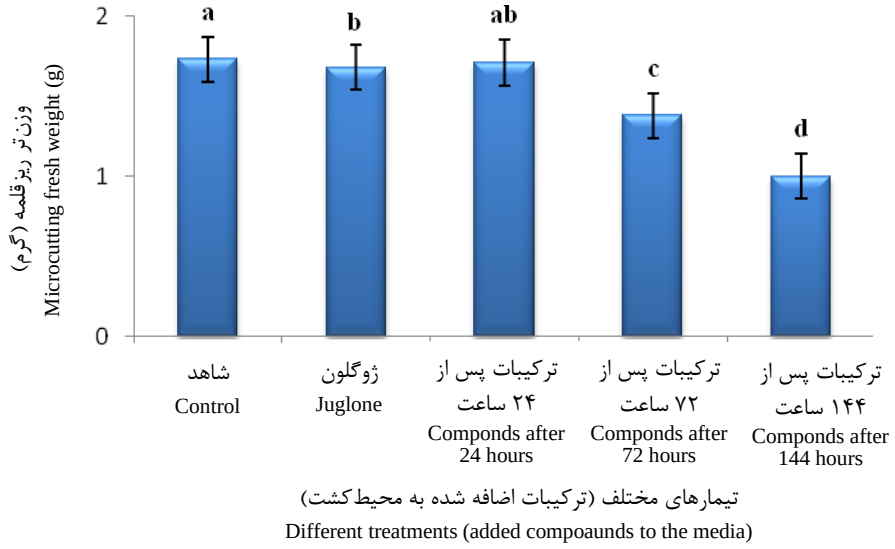
Fig. 6: Comparison of fresh weight variation in Jamal and Chandler cultivars microcutting on basal medium containing juglone and other exuded compounds into liquid media 24, 72 and 144 h after culture

مقایسه تغییرات وزن‌تر ریزقلمه‌های ارقام جمال و چندلر در محیط‌کشت پایه محتوی ژوگلون و دیگر ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت مایع بعد از ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت

بررسی تغییرات وزن‌تر برحسب زمان نشان می‌دهد که در هر دو رقم موردمطالعه، بالاترین میزان وزن‌تر متعلق به روز ۲۸ از نمونه‌برداری و کم‌ترین میزان وزن‌تر متعلق به روز هفتم نمونه‌برداری است و در وزن‌تر ریزقلمه در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود (شکل ۶). مسلم است که هرچه از عمر ریزقلمه‌های ارقام مختلف می‌گذرد، میزان وزن‌تر آن‌ها نیز افزایش می‌یابد، اما این اختلاف در بین ارقام موردمطالعه معنی‌دار نبود.

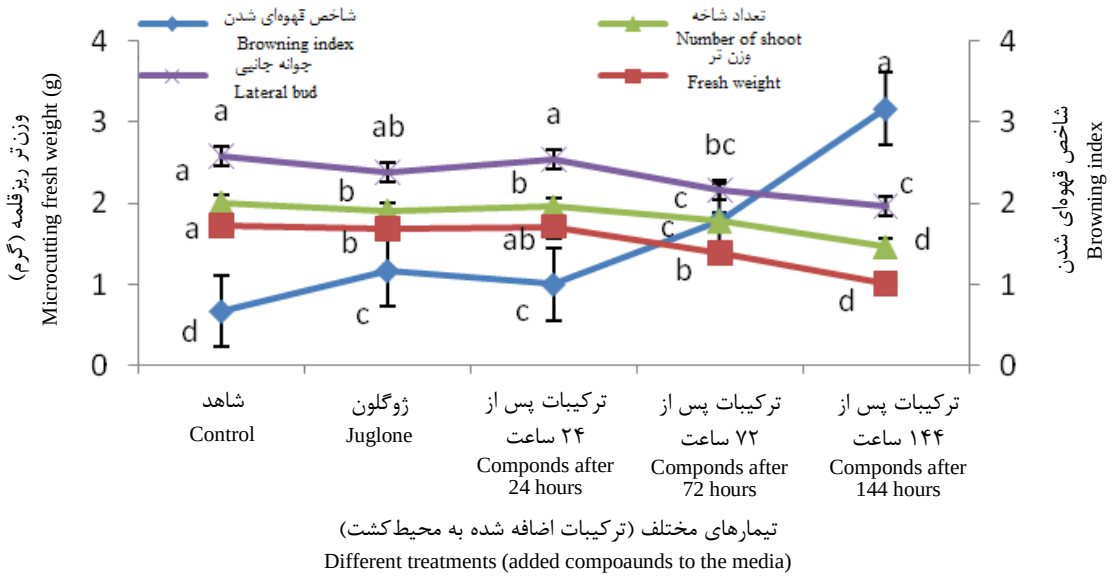
مقایسه وزن‌تر ارقام با یکدیگر در طول زمان‌های ارزیابی با آزمون فاکتوریل نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ارقام در زمان‌های مختلف وجود ندارد. بررسی تأثیر تیمارهای اعمال شده بر وزن‌تر (شکل ۷) نشان داد که بالاترین میزان تغییرات وزنی که بیانگر بالاترین میزان رشد است در ریزقلمه‌های تیمار شاهد حاصل شده است که با سایر تیمارها به‌جز تیمار ترکیبات فنلی تراوش شده بعد از ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری داشت.

بین تیمار ترکیبات فنلی تراوش شده بعد از ۲۴ ساعت و ژوگلون تفاوت معنی‌داری از نظر تغییرات وزنی ریزقلمه وجود نداشت. تیمار ترکیبات فنلی تراوش شده بعد از ۷۲ ساعت میزان رشد ریزقلمه کمتری نسبت به تیمارهای قبلی داشت و این درحالی است که ضعیف‌ترین رشد از نظر پارامترهای اندازه‌گیری شده وزن‌تر، رشد طولی شاخه جدید و تعداد جوانه جانبی ریزقلمه‌ها در محیط محتوی ترکیبات فنلی تراوش شده بعد از ۱۴۴ ساعت در محیط‌کشت دیده شد که در مقایسه با دیگر تیمارها کم‌ترین رشد را داشتند.



شکل ۷: تأثیر اضافه کردن ترکیبات تراوش شده به محیط‌کشت مایع ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت و ژوگلون در وزن تر ریزقلمه

Fig. 7: Effect of adding exuded compounds to the media 24, 72 and 144 h after culture and juglone on microcutting fresh weight



شکل ۸: تأثیر اضافه کردن ترکیبات تراوش شده در کشت مایع ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت و ژوگلون بر شاخص‌های رشد و شاخص قهوه ای شدن ریزقلمه ارقام جمال و چندلر

Fig. 8: Effect of adding exuded compounds to the media 24, 72 and 144 h after culture and juglone on growth and browning index in Jamal and Chandler cultivars microcutting

تأثیر اضافه کردن ترکیبات تراوش شده در محیط‌کشت مایع ۱، ۳ و ۶ روز پس از کشت و ژوگلون بر شاخص‌های رشد و شاخص قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه ارقام جمال و چندلر

با ارزیابی شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده ریزقلمه‌های کشت شده در دوره استقرار و مقایسه آن‌ها با یکدیگر (شکل ۸) می‌توان دریافت که بهترین وضعیت رشد و کم‌ترین شاخص قهوه‌ای شدن مربوط به ریزقلمه‌هایی است که هیچ ماده‌ای به محیط‌کشت اضافه نشده است (تیمار شاهد) که نشان‌دهنده تأثیر منفی (به نسبت کم یا زیاد) هر یک از مواد اضافه شده در این آزمایش بر این شاخص‌ها و بر استقرار ریزقلمه در محیط‌کشت است. اضافه کردن ژوگلون در محیط‌کشت هر چند سبب شده که ریزقلمه‌ها رشد کمتری نسبت به تیمارهای شاهد و اضافه کردن ترکیبات تراوش شده بعد از ۲۴ ساعت داشته باشد ولی ریزقلمه‌ها رشد بهتری نسبت به دو تیمار اضافه کردن ترکیبات تراوش شده بعد از ۷۲ و ۱۴۴ ساعت به محیط‌کشت داشتند و اضافه کردن ژوگلون از نظر شاخص قهوه‌ای‌شدن اختلاف معنی‌داری با اضافه کردن ترکیبات تراوش شده بعد از ۲۴ ساعت نداشت. اضافه کردن ترکیبات تراوش شده بعد از ۷۲ ساعت به محیط‌کشت سبب کاهش محسوس رشد و کاهش شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری شده و در عین حال افزایش شاخص قهوه‌ای‌شدن در مقایسه با تیمارهای قبلی شد. در نهایت، اضافه کردن ترکیبات تراوش شده بعد از ۱۴۴ ساعت به محیط‌کشت کم‌ترین تغییرات رشد را در پی داشت و شاخص‌های رشد در مقایسه با دیگر تیمارها (تمام مواد دیگر اضافه شده به محیط‌کشت) کاهش معنی‌داری داشت. از طرف دیگر، بالاترین شاخص قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه در محیط‌کشت با اضافه کردن ترکیبات تراوش شده بعد از ۱۴۴ ساعت به محیط‌کشت حاصل شد.

اضافه کردن ترکیب ژوگلون به تنهایی هرچند سبب کم شدن رشد و شاخص‌های رشدی در مقایسه با تیمار شاهد شده است اما نمی‌تواند ثابت نماید که این ترکیب به‌تنهایی مانع اصلی عدم استقرار ریزقلمه در محیط‌کشت است، بسا این‌که در تحقیق چنیانی و همکاران (۱۳۹۰) ژوگلون اثر مثبتی بر میزان رشد داشته و موجب افزایش وزن‌تر ریزقلمه‌ها در کل دوره تکثیر شده است که از این لحاظ، با نتایج این تحقیق مغایرت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

اضافه کردن ترکیبات تراوش شده به محیط‌کشت جامد نشان داد که ترکیبی از مواد در مقایسه با ترکیب ژوگلون به تنهایی که در روزهای آغازین پس از کشت ریزقلمه به محیط‌کشت تراوش می‌شوند با هم اثرگذار بوده و سبب قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه و محیط‌کشت و در نهایت، سبب عدم‌استقرار ریزقلمه در محیط‌کشت می‌شود. با گذشت زمان از تاریخ کشت ریزقلمه در محیط‌کشت، تراوش ترکیبات متعدد فنلی به محیط‌کشت در ۲۴ ساعت (۱ شبانه‌روز)، ۷۲ ساعت (۳ شبانه‌روز) و ۱۴۴ ساعت (۶ شبانه‌روز) آغازین پس از کشت افزایش یافته و نوع ترکیبات نیز تا حدودی تغییر می‌یابد و هم‌چنان‌که با گذشت زمان از تاریخ کشت، مقادیر این ترکیبات در محیط‌کشت بالا می‌رود، احتمال بقاء و استقرار ریزقلمه در محیط‌کشت نیز کاهش می‌یابد. با توجه به این یافته‌ها، بایستی در روزهای آغازین پس از کشت این ترکیبات فنلی انباشته شده در محیط‌کشت را یا از دسترس خارج نمود و یا به آن‌ها اجازه فعال نمودن آنزیم‌های اکسیداتیو درگیر در قهوه‌ای‌شدن ریزقلمه را نداد.

منابع

چنیانی، م.، ابراهیم‌زاده، ح.، مسعودی‌نژاد، ع. و وحدتی، ک. ۱۳۹۰. مطالعه فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنومیکی برخی آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنلی و اثر آن‌ها در ریشه‌زایی برخی ارقام گردو. رساله دکتری. دانشگاه تهران. ۳۳۵ صفحه.

یاری، م. ب.، غـــلامی، م. و اثنـــی‌عشـــری، م. ۱۳۹۰. اثر زمان نمونه‌گیری، نوع و آرایش کشت ریزنمونه‌ها و نوع آنتی‌اکسیدان بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های گردوی ایرانی در شرایط درون‌شیشه‌ای. نشریه علوم باغبانی ایران، ۴۲ (۲): ۱۴۱-۱۴۹.

Amaral, J. S., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valenta˜o, P., Pereira, J. A. and Ferreres, F. 2004. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. Journal of Food Chemistry, 88: 373-379.

Amaral, J. S., Valentao, P., Andrade, P. B., Martins, R. C. and Seabra, R. M. 2008. Do cultivar, geographical location and crop season influence phenolic profile of walnut leaves? Molecules, 13: 1321-1332.

Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. and Nicolas, J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. Journal of Food Science, 57: 958-962.

Barz, W., Koester, J., Weltring, K. M. and Strack, D. 1985. Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals, in: Van Sumere, C. V., Lea, P. J. (Eds.), The Biochemistry of Plant Phenolics. Blackwell Publishing, Oxford, 307-347.

Biedermann, I. E. C. 1987. Factors affecting establishment and development of *Magnolia hybrids in vitro*. Acta Horticulturae, 212: 625-629.

Borazjani, A., Graves, C. H. and Hedin, P. A. 1985. Occurrence of juglone in various tissues of pecan and related species. Phytopathology, 75: 1419-1421.

Caboni, E., Tonelli, M. G., Lauri, P., Iacouacci, P., Kevers, C., Damiano, C. and Gaspar, Th. 1997. Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability. Biologia Plantarum, 39 (1): 91-97.

Chavan, S. S., Ranade, S. S., Deore, A. C., Deshpande, R. S. and Dhonukshe, B. L., 2000. Cloning of Alphonso mango through vegetative explants. Annals Plant Physiology, 14 (2): 178-181.

Cheng, G. W. W. and Crisosto, C. H. 1995. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. Journal of the American Society for Horticultural Science, 120: 835-838.

Cheniany, M., Ebrahimzadeh, H., Vahdati, K., Preece, J. E., Masoudinejad, A. and Mirmasoumi, M. 2012. Content of different groups of phenolic compounds in microshoots of *Juglans regia* cultivars and studies on antioxidant activity. Acta Physiologiae Plantarum, 35 (2): 443-450.

Claudot, A. C., Drouet, A. and Jay-Allemand, C. 1992. Tissue distribution of phenolic compounds in annual shoots from adult and rejuvenated walnut trees. Plant Physiology Chemistry, 30: 61-68.

Claudot, A. C., Ernst, D., Sandermann, H. and Drouet, A. 1997. Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult andrejuvenetad walnut trees. Planta, 203: 275-282.

Cline, S. and Neely, D. 1984. Relationship between juvenile-leaf resistance to anthracnose and the presence of juglone and hydrojuglone glucoside in black walnut. Phytopathology, 74 (2): 185-188.

Colaric, M., Veberic, R., Solar, A., Hudina, M. and Stampar, F. 2005. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (16): 6390-6396.

Cosmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G., Botu, M., Baciu, A. and Gruia, M. 2010. Phenolics of green husk in mature walnut fruits. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38 (1): 53-56.

Cosmulescu, S. N. and Trandafir, I. 2011. Seasonal variation of total phenols in leaves of walnut (*Juglans regia* L.). Journal of Medicinal Plants Research, 5 (19): 4938-4942.

De Klerk, G. J., Van Der Krieken, W. and De Jong, J. C. 1999. The formation of adventitious roots: newconcepts, new possibilities. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 35: 189-199.

Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. Journal of Plant Cell Reports, 7: 1085-1097.

Dobránszki, J. and Teixeira, J. A. 2010. Micropropagation of apple. Biotechnology Advances, 28: 462-488.

Dobránszki, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T. and Szalai, J. 2000a. *In vitro* shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. Journal of Horticultural Science, 6: 36-39.

Dobránszki, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Bubán, T. and Szalai, J. 2000b. Single and dual effects of different cytokinins on shoot multiplication of different apple scions. Journal of Horticultural Science, 6: 76-78.

Dobránszki, J., Magyar-Tábori, K., Jámbor-Benczúr, E., Lazányi, J., Bubán, T. and Szalai, J. 2000c. Influence of aromatic cytokinins on shoot multiplication and their post-effects on rooting of apple cv. Húsvéti rozmaring. Journal of Horticultural Science, 6: 84-87.

Driver, J. A. and Kuniyuki, A. H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. Journal of Horticultural Science, 19: 507-509.

Duroux, L., Fontaine, F., Breton, Ch., Charpentier, J. P., Doumas, P. and Jay-Allemand, Ch. 1997. Histological and biochemical characterization of adventitious root formation in walnut cotyledonsfragments. In: Altman, A., Warsel, T. (Eds.) Biology of root formation and development. PlenumPress. New York. 75-84.

Ehsanpour, A. and Amini, F. 2001. Plant cell and tissue culture. JDM Press, 181p.

Ercisli, S., Esitken, A., Turkkal, C. and Orhan, E. 2005. The allelopathic effects of juglone and walnut leaf extractson yield, growth, chemical and PNE compositions of strawberry cv. Fern. Plant, Soil and Environment, 51 (6): 283-287.

Faivre-Rampant, O., Charpentier, J. P., Kevers, C., Dommes, J., Van Onckelen, H., Jay-Allemand, C. and Gaspar, T. 2002. Cuttings of the non-rooting rac tobacco mutant overaccumulate phenolic compounds. Funct. Plant Biology, 29: 63-71.

Girzu, M. Carnat, A. Privat, A. M. Fiaplip, J. Carnat, A. P. and Lamaison, J. L. 1998. Sedative effect of walnut leaf extract and juglone, an isolated constituent. Pharmaceutical Biology, 36 (4): 280-286.

Goupy, P., Amiot, M. J., Richard-Forget, F., Duprat, F., Aubert, S. and Nicolas, J. 1995. Enzymatic browning of model solutions and apple extracts by apple polyphenoloxidase. Journal of Food Science, 60: 497-501.

Gueldner, R. C., Yates, I. E., Reilly, C. C., Wood, B. W. and Smith, M. T. 1994. Concentrations of a hydrojuglone glucoside in developing pecan leaves in relation to scab susceptibility. Journal of the American Society for Horticultural Science, 119: 498-504.

Hedin, P. A., Langhans, V. E. and Graves, C. H. 1979. Identification of juglone in pecan asa possible factor of resistance to *Fusicladium effusum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27 (1): 92-94.

Hejl, A., Einhellig, F. A. and Rasmussen, J. A. 1993. Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. Journal of Chemical Ecology, 19: 559-568.

Huang, L. C., Lee, Y. L., Huang, B. L., Kuo, C. I. and Shaw, J. F. 2002. High polyphenoloxidase activity and low titrable acidity in browning of bamboo tissue culture. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 38 (4): 355-365.

Jakopic, J., Colaric, M., Veberic, R., Hudina, M., Solar, A. and Stampar, F. 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolicscontent in walnut liqueur? Journal of Food Chemistry, 104 (1): 100-105.

Jay-Allemand, C. and Drouet, A. 1989. Polyphenole und Enzyme als biochemische Marker der VerjuÈ ngung bei Walnuss. Erwerb-sobstbau, 31: 63-69.

Jay-Allemand, C., Charpentier, J. P., Bruant, B., Burtin, P., Fady, B. and Lefevre, F. 2001. Genetic of phenolic compounds in walnut: qualitative and quantitative variations among cultivars. Acta Horticulturae, 544: 73-81.

Jay-Allemand, C., Drouet, A., Ouaras, A. and Cornu, D. 1989. Polyphenolic and enzymatic characterization of ageing and rejuvenation of walnut trees (*Juglans nigra* × *Juglans regia*): relationship to growth. Annals of Forest Science, 46 Supplement, 190-193.

Jiang, Y. M., Liu, S. X., Zhang, D. L., Chang, F. and Li, Y. B. 1995. Studies on antibrowning of coconut (*Cocos nucifera* L.) fruit. Tropical Agriculture, 72: 254-256.

Kocacaliskan, I. and Terzi, I. 2001. Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seedgermination and seedling growth. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 76: 436-440.

Langhans, V. E., Hedin, P. A. and Graves, C. H. 1978. Fungitoxic chemicals in pecan tissue. Plant Disease Report, 62: 894-898.

Lee, K. C. and Campbell, R. W. 1969. Nature and occurrence of juglone in *Juglans nigra* L. Journal of Horticultural Science, 4: 297-298.

Mahoney, N., Molyneux, R. J. and Campbell, B. C. 2000. Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). Journal of Agricultural andFood Chemistry, 48: 4418-4421.

McGranahan, G. and Leslie, C. A. 1987. *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars. Journal of Horticultural Science, 23 (1): 220.

Nag, S., Saha, K. and Choudhri, M. A. 2001. Role of auxin and polyamines in adventitious rootformation in relation to changes in compounds involved in rooting. Journal of Plant Growth Regulation, 20: 182-194.

Quaddoury, A. and Amssa, M. 2004. Effect of exogenous indole butyric acid on root formation and peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase activities and phenolic contents in date Palm offshoots. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 127-131.

Radix, P., Bastien, C., Jay-Allemand, C., Charlot, G. and Siegle-Murandi, F. 1998.The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues. A possible explanation of differences in the expression of walnut blight. Agronomie, 18 (10): 627-637.

Radix, P., Siglemurandi, F. and Charlot, G. 1994. Walnut blight-development of fruit infection in 2 orchards, Crop Protection, 13 (8): 629-631.

Rietvel, W. J. 1982. The significance of allelopathy in black walnut cultural systems. Northern Nut Growers Association. Annual Reports, 72: 117-134.

Rietvel, W. J. 1983. Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. Journal of Chemical Ecology, 9: 295-308.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Journal of Food Chemistry, 66: 401-436.

Ruechmann, S., Leser, C., Bannert, M. and Treutter, D. 2002. Relationship between growth, secondary metabolism, and resistance of apple. Plant Biology, 4 (2): 137-143.

Solar, A., Colarič, M., Usenik, V. and Stampar, F. 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Plant Science, 170 (3): 453-461.

Stampar, F. Solar, A., Hudina, M., Veberic, R. and Colaric, M. 2006. Traditionalwalnut liquor-cocktail of phenolics. Journal of Food Chemistry, 95 (4): 627-631.

Tabiyeh, D. T., Bernard, F. and Shacker, H. 2006. Investigation of glutathione, salicylicacid and GA3 on browning in *Pistacia vera* shoot tips cultures. Acta Horticulturae, 726: 201-204.

Teixeria, J. B., Sondahl, M. R. and Kirby, E. G. 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. Journal of Plant Cell Report, 13: 247-50.

Treutter, D. 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. Journal of Plant Growth Regulation. 34: 71-89.

Usenik, V., Osterc, G., Mikulicˇ-Petkovsˇek, M., Trobec, M., Vebericˇ, R., Colaricˇ, M., Solar, A. and Štampar, F. 2004. The involvement of phenolic compounds in the metabolism of fruit trees, in: Razprave, IV, razreda, SAZU, Ljubljana, 187-204.

Wang, Q., Tang, H., Quan, Y. and Zhou, G. 1994. Phenol induced browning and establishment of shoottip explants of Fuji apple and Jinhua pear cultured *In vitro*. Journal of HortScience, 69: 833-839.

Wichtl, M. and Anton, R. 1999. Plantes therapeutiques. Paris: Tec. & Doc, 291-293.

Wilson, P. J. and van Staden, J. 1990. Rizocaline, rooting co-factors, and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting-a review. Annals of Botany, 66: 479-490.

Yang, H., Zhou, C. W. U. F. and Cheng, J. 2010. Effect of nitric oxide on browning and lignifications of peeled bamboo shoots. Journal of Postharvest Biology and Technology, 57: 72-76.

Investigation of Phenolic Compounds Exuded from Single Node Microcuttings of Walnut into Liquid Culture Medium DKW

Ehteshamnia[1], A. and Gholami[2*], M.

Abstract

In order to study the amounts of some phenolic compounds exuded from single node walnut explants in liquid medium (DKW), this experiment was performed in the form of a split units in time experiment based on split block design with three factors including cultivar in two walnut cultivars namely Chandler and Jamal, time of sampling in four levels including May 5 th, May 21st, July 5th and September 5th and the time of liquid culture assessment in three levels (24, 72 and 144 hours after the culture) using HPLC with three replicates. In independent experiment, phenolic compounds exuded in liquid medium 24, 72 and 144h after the culture and juglone were added to solid medium. The results showed that in terms of the 14 phenolic compounds (Ellagic, Vanillic, Coumaric, Chlorogenic, Caffeic, Gentistic Ferulic Syringic Cinamic acid, Catechin, Rutin and Myricetin, Juglone and 1,4 Naphthoquinone) in shoots and medium the cultivars were not significantly different but the time of sampling and liquid culture assessment showed significant differences between the cultivars. The results showed that Juglone, Myricetin, Ellagic and Vanillic acid were present in the current year shoots in higher amounts than other phenolic compounds and Juglone, Ellagic acid and Myricetin had the highest leakage in the culture medium. Adding exuded phenolic compounds after 144h in the solid medium had the lowest growth and fresh weight change of microcutting and significant difference with other treatments.The over all results of this study showed that Juglone, Ellagic acid and Myricetin are possibly the main obstacles to the fully succeed microcuttings establishment of two Jamal and Chandler cultivars.

Keywords: Juglone, Jamal, Chandler, Browning

1 and 2. PhD Student and Professor, Respectively, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

※: Corresponding author Email: mgholami@basu.ac.ir