

تأثیر زمان تهیه ریزنمونه و شرایط محیط کشت بر استقرار ریزنمونه دو رقم گردو؛ جمال و چندلر

Effect of Explant Sampling Time and Culture Medium Conditions on Explant Establishment of Two Walnut Cultivars; Chandler and Jamal

عبداله احتشام‌نیا^۱، منصور غلامی^{۲*} و محمود اثنی‌عشری^۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۲۳
(مقاله پژوهشی)

چکیده

از موانع اصلی استقرار ریزنمونه در ریزازدیادی گردو، اکسیدشدن ترکیبات فنلی تراوش شده به درون محیط کشت، قهوه‌ای شدن محیط کشت و توقف رشد ریزنمونه است. این پژوهش، بر اساس یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل رقم (جمال و چندلر)، زمان تهیه ریزنمونه (اردیبهشت، تیر و شهریورماه) و شرایط محیط کشت (اضافه کردن ذغال فعال به محیط کشت، قرارگیری کشت‌ها در تاریکی ۲۴ و ۷۲ ساعت، واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، دو مرتبه هر ۷۲ ساعت و یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت و شاهد) انجام پذیرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به استقرار ریزقلمه در محیط کشت نشان داد که رقم، زمان تهیه ریزقلمه و شرایط محیط کشت و اثرات متقابل آن‌ها به جز اثر متقابل رقم و زمان تهیه ریزقلمه دارای اثر معنی‌داری در سطح یک درصد بر استقرار ریزقلمه‌های دو رقم جمال و چندلر بودند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، به‌ترتیب تیمارهای واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت و اضافه نمودن ذغال فعال بالاترین میزان استقرار ریزقلمه در محیط کشت را نشان دادند و از این نظر اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشتند. از طرف دیگر، نتایج همبستگی صفات حاکی از آن بود که بین شاخص قهوه‌ای شدن و میزان استقرار ریزقلمه همبستگی منفی معنی‌دار ($-0/86$) وجود داشت. در تیمارهای موردبررسی، رقم چندلر میزان استقرار ریزقلمه بالاتری نسبت به رقم جمال داشت. در نهایت چنین نتیجه‌گیری شد که تهیه ریزقلمه در اردیبهشت‌ماه، در شرایط واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت و اضافه نمودن ذغال فعال بهترین اثربخشی را در استقرار ریزقلمه‌های دو رقم چندلر و جمال نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، قهوه‌ای شدن، ترکیبات فنلی، ذغال فعال

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران

*: نویسنده مسئول Email: mgholami@basu.ac.ir

مقدمه

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) از خانواده ژوگلانداسه^۱ است. در تکثیر گیاه از طریق بذر، گیاهان جدیدی با صفات ژنتیکی متفاوت از گونه والد تولید می‌شود. بنابراین، برای رسیدن به یک ساختار ژنتیکی از درخت بالغ برگزیده و ازدیاد انبوه آن، روش‌های تکثیر غیرجنسی توصیه شده است. از مزایای ریزازدیادی گردو، ایجاد تعداد زیاد گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی در زمانی کوتاه نسبت به روش‌های مرسوم است. تکنیک‌های کشت بافت گردوی ایرانی توسط بسیاری از محققین گزارش شده است. نخستین تلاش‌ها در ریزازدیادی گردو با استفاده از محیط کشت‌های موجود که مناسب دیگر گیاهان چوبی بود، انجام شد. در تحقیقات انجام شده در مورد ریزازدیادی گردو محیط کشت‌های مختلف از قبیل DKW (درايور و کونیوکی^۲، ۱۹۸۴)، چنگ (چنگ^۳، ۱۹۷۵)، موراشیگ و اسکوگ (MS) (موراشیگ و اسکوگ^۴، ۱۹۶۲)، B5 (گامبورک^۵ و همکاران، ۱۹۶۸) و محیط کشت گیاهان چوبی^۶ (WPM) (لوتید و مک کاون^۷، ۱۹۸۱) مورد بررسی قرار گرفت که از میان آن‌ها، مشخص شد محیط کشت DKW (درايور و کونیوکی، ۱۹۸۴) مناسب گونه‌های مختلف خانواده ژوگلانداسه از قبیل گردوی ایرانی است. مک گرناهان^۸ و همکاران (۱۹۸۷) دستورالعمل تغییر یافته این محیط کشت را تحت عنوان DKW-C معرفی نمودند و در سال‌های اخیر این محیط کشت همراه با اعمال تغییراتی در آن به‌طور وسیعی به‌عنوان محیط کشت پایه گردو بکار می‌رود. با این وجود، در گیاهانی مانند گردو که به‌طور طبیعی سرشار از ترکیبات فنلی هستند یکی از مشکلات اصلی در ارتباط با کشت درون شیشه‌ای آن‌ها، تراوش ترکیبات فنلی از سطح برش یافته ریزنمونه و اکسیدشدن این ترکیبات فنلی تراوش شده از ریزنمونه است که از چالش‌های ازدیاد موفق گردو محسوب می‌شود (رایوز لیال^۹ و همکاران، ۲۰۰۷؛ طوسی و دیلمگانی^{۱۰}، ۲۰۱۰). در این حالت ریزنمونه‌ها قادر به رشد نخواهند بود و سرانجام از بین می‌روند (کوردک و آکی^{۱۱}، ۲۰۱۱).

موفقیت در مرحله آغازین ریزازدیادی توسط پارامترهای مختلفی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. مراحل بحرانی در موفقیت و

استقرار مناسب ریزنمونه‌های خشک‌بارها (رایوز لیال و همکاران، ۲۰۰۷؛ پریز تورنرو و بارگاس^{۱۲}، ۲۰۰۷) در ارتباط با ضدعفونی ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده و جلوگیری از قهوه‌ای شدن فنلی ریزنمونه‌ها است که این موارد بستگی به نوع ریزنمونه، روش ضدعفونی و شرایط فیزیکی و شیمیایی در کشت درون شیشه‌ای و غیره دارد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های مختلف با روش یکسان به مراحل ازدیاد درون شیشه‌ای از قبیل استقرار، پرآوری و ریشه‌زایی پاسخ مشابهی نمی‌دهند (عبدالقادر^{۱۳} و همکاران، ۱۹۹۱؛ کارهو و زیمرمن^{۱۴}، ۱۹۹۳).

گزارشات نشان می‌دهد که میزان قهوه‌ای شدن بافت تحت تأثیر چندین فاکتور قبل و بعد از تهیه ریزنمونه قرار گرفته و هم‌چنین بستگی به فصل جمع‌آوری ریزنمونه‌ها نیز دارد (ورنر و بو^{۱۵}، ۱۹۸۰؛ ویستر و جونز^{۱۶}، ۱۹۸۹؛ مارین^{۱۷} و همکاران، ۱۹۹۳؛ پیس و آلدوینکل^{۱۸}، ۱۹۹۴؛ مادگیل^{۱۹} و همکاران، ۱۹۹۹؛ دابرانسکی^{۲۰} و همکاران، ۲۰۰۰a؛ کاوشال^{۲۱} و همکاران، ۲۰۰۵). اکسیدشدن ترکیبات فنلی تراوش یافته از انتهای برش یافته ریزنمونه‌ها توسط پلی فنل اکسیدازها و پراکسیدازها سبب قهوه‌ای شدن ریزنمونه و محیط کشت می‌شود (بات و چندل^{۲۲}، ۱۹۹۱). تحقیقات در زمینه کمیّت و کیفیت ترکیبات فنلی در اندام‌های مختلف درخت گردو نشان داده است که محتوی ترکیبات فوق در این درخت، به عواملی نظیر ژنوتیپ (سولار^{۲۳} و همکاران، ۲۰۰۶)، موقعیت جغرافیایی، شرایط اقلیمی محل زیست (آمارال^{۲۴} و همکاران، ۲۰۰۴) و هم‌چنین به مرحله نمو گیاه بستگی دارد (سولار و همکاران، ۲۰۰۶). آمارال و همکاران (۲۰۰۴) ضمن گزارش وجود همبستگی بین مقاطع زمانی فصل رشد و محتوی ترکیبات فنلی برگ‌های گردو، بالاترین محتوی این ترکیبات را بین ماه‌های می و جولای اعلام کرده‌اند. نتایج تحقیق آشاتوش و همکاران (۲۰۰۳) که به بررسی ارتباط تراوش ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه در کشت بافت انار پرداختند، نشان داد که سه مرتبه واکشت ریزنمونه‌ها، سبب کنترل قهوه‌ای شدن در مقایسه با کاربرد ذغال فعال و اسید اسکوربیک شده است. در پژوهشی دیگر، سولار و همکاران

12. Perez. Tornero and Burgos

13. Abdul Kader

14. Karhu and Zimmerman

15. Werner and Boe

16. Webster and Jones

17. Marin

18. Yepes and Aldwinckle

19. Modgil

20. Dobránszki

21. Kaushal

22. Bhat and Chandel

23. Solar

24. Amaral

1. Juglandaceae

2. Driver and Kuniyuki

3. Cheng

4. Murashige and Skoog

5. Gamborg

6. Woody plants medium

7. Lloyd and McCown

8. McGranahan

9. Ríoz leal

10. Toosi and Dilmagani

11. Corduk and Aki

ریزقلمه‌ها در زیر هود سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند.

شرایط کشت

از محیط کشت DKW (شامل عناصر ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها) حاوی ۰/۸ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز بدون مواد تنظیم‌کننده رشد به‌عنوان محیط کشت پایه کشت استفاده شد. pH محیط کشت با استفاده از سود ۰/۱ نرمال و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال روی ۵/۸ تنظیم شد. سپس ۳۰ سی‌سی محیط کشت در هر شیشه کشت توزیع گردید. سپس شیشه‌های کشت در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۳ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. سپس در زیر هود لامینار و در شرایط استریل ریزقلمه‌ها در شیشه‌ها کشت شدند. تمامی شیشه‌ها تا ۳۰ روز در شرایط مشابه در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و در یک دوره نوری ۱۶ ساعته با لامپ فلوروسنت سفید نگه داشته شدند و فقط در دو تیمار تاریکی، نمونه‌ها به مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت در اتاقک رشد با فویل پوشانده شده و پس از طی آن، فویل‌ها برداشته شد.

ارزیابی میزان فنل کل و فلاونوئید کل شاخه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Cary 100 UV/Visible، ساخت شرکت Varian، کشور استرالیا) انجام شد. به‌علت بالا بودن غلظت ترکیبات فنلی در عصاره‌های شاخه تهیه شده در ماه‌های تیر و شهریور نسبت به اردیبهشت‌ماه این نمونه‌ها به ترتیب سه و شش بار رقیق شدند.

سنجش فنل کل

ارزیابی میزان فنل کل بر اساس روش کار سینگلتن و راسی (1965) و با استفاده از معرف Folin-Ciocalteu انجام شد. پنج گرم از بافت شاخه را با استفاده از سه میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد له کرده و سپس از کاغذ صافی عبور داده شد. ۳۰۰ میکرولیتر از این محلول را در لوله آزمایش ریخته، به آن ۱۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ درصد و پس 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، برحسب میکروگرم گالیک اسید در یک گرم بافت تازه بیان شد.

سنجش فلاونوئید کل

ارزیابی میزان فلاونوئید کل بر اساس روش قاسمی و همکاران (2010) انجام شد. بدین صورت که ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره

(2006) به بررسی تغییرات فصلی فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و کوئینون‌های انتخابی در شاخه‌های یک‌ساله گردو پرداختند. نتایج این بررسی نشان داد که غلظت فنل‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر رقم، تاریخ نمونه‌گیری و اثر متقابل بین رقم و تاریخ نمونه‌گیری قرار می‌گیرد.

در همین راستا در پژوهش دیگر، یاری و همکاران (۱۳۹۰) به بررسی اثر زمان نمونه‌گیری، نوع و آرایش کشت ریزنمونه‌ها و نوع آنتی‌اکسیدان بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه‌ای پرداختند. نتایج این پژوهش نشان داد که تهیه ریزنمونه مرستم انتهایی و تک‌گره در ابتدای فصل رشد و قرارگیری ریزنمونه به‌صورت عمودی در محیط کشت و استفاده از آنتی‌اکسیدان سبب استقرار و رشد بهتر ریزنمونه در مقایسه با شاهد خواهد شد.

پژوهش حاضر، که به بررسی روش‌های موفقیت در استقرار ریزقلمه‌های گردو در دو رقم جمال و چندلر پرداخته است با هدف امکان به‌کارگیری روش‌های پیشگیری‌کننده از قهوه‌ای شدن ریزقلمه و محیط کشت و با تعیین زمان مناسب تهیه ریزقلمه و ارزیابی شرایط بهینه محیط کشت در بهبود استقرار ریزقلمه‌ها انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی موردنیاز این پژوهش در روز بیستم ماه‌های اردیبهشت، تیر و شهریور سال ۱۳۹۱ از شاخه‌های سالجاری درختان بالغ ارقام جمال^۱ و چندلر^۲ موجود در ایستگاه تحقیقات گردوی تویسرکان تهیه گردید. در زمان‌های ذکر شده، شاخه‌های سال جاری از درختان قطع و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و سپس به‌صورت تک‌گره^۳ تهیه و ضدعفونی شده و هر ریزقلمه در تیمارهای مخصوص خود (جدول ۱) در محیط کشت‌های مختلف کشت شد.

ضدعفونی ریزقلمه

پس از تهیه ریزقلمه به‌صورت قطعات کوچک تک‌گره (طول ۳ تا ۵ سانتی‌متر)، ریزقلمه‌ها به مدت ۵±۲ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده شدند. پس از آن، به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول تازه هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد با دو قطره تونین ۲۰ قرار گرفته و نهایتاً

1. Jamal
2. Chandler
3. Single Node

تهیه شده را با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط و به آن ۰/۱ میلی‌لیتر نیترات آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، میزان جذب در ۴۱۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید کل از روی میزان جذب نمونه و مقایسه آن با استاندارد، برحسب میکروگرم کوئرستین در یک گرم بافت تازه بیان شد.

رقم در دو سطح (ارقام جمال و چندلر) و زمان تهیه ریزقلمه در سه سطح (شامل اردیبهشت، تیر و شهریور) و شرایط محیط‌کشت پایه در هفت سطح (اضافه کردن ذغال فعال به محیط‌کشت (۰/۲ درصد)، قرارگیری کشت‌ها در تاریکی ۲۴ و ۷۲ ساعت، واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، دو مرتبه هر ۷۲ ساعت و یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت و شاهد) اعمال شدند (جدول ۱). صفاتی مانند میزان استقرار (درصد)، ارتفاع شاخه تازه رشد یافته (سانتی‌متر)، تعداد شاخه و تعداد برگ در هر ریزقلمه ارزیابی و همچنین محتوی فنل کل و فلاونوئید کل شاخه در ماه‌های نمونه‌گیری مورد سنجش قرار گرفت. قهوه‌ای شدن ریزقلمه در محیط‌کشت بر اساس شاخص قهوه‌ای شدن ارزیابی گردید (یانگ^۱ و همکاران، ۲۰۱۰). مساحت قهوه‌ای شده ریزقلمه‌ها بوسیله 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 ۱۰-۲۵ درصد، =۳ سطح قهوه‌ای شده ۲۵-۵۰ درصد، =۴ سطح قهوه‌ای شده بیش‌تر از ۵۰ درصد. شاخص قهوه‌ای شدن براساس روش یانگ و همکاران (۲۰۱۰) ارزیابی شد:

$$\text{شاخص قهوه‌ای شدن} = \frac{\text{میانگین سطح قهوه‌ای شده} \times \text{تعداد ریزقلمه یا سطح قهوه‌ای شدن}}{\text{تعداد کل ریزقلمه‌ها}}$$

برای این منظور ریزقلمه به‌عنوان یک استوانه در نظر گرفته شد و ابتدا مساحت کل ریزقلمه و سپس مساحت سطح قهوه‌ای شده یک ریزقلمه محاسبه شد. سپس درصد مساحت قهوه‌ای شده یک ریزقلمه مشخص شد. سپس با قرار دادن میانگین درصد مساحت قهوه‌ای شده ریزقلمه‌ها و تعداد ریزقلمه قهوه‌ای شده و تعداد کل ریزقلمه در هر تکرار و سپس هر تیمار از طریق فرمول بالا شاخص قهوه‌ای شدن محاسبه گردید و مساحت سطح قهوه‌ای شده ریزقلمه‌ها در هر تیمار در یکی از ۵ مقیاس مذکور قرار گرفت.

محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل استقرار ریزقلمه در تیمارهای موردنظر به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ فاکتور شامل رقم و زمان تهیه ریزقلمه و شرایط محیط‌کشت در سه تکرار و هر تکرار ۲۰ ریزقلمه با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ انجام پذیرفت. همچنین، مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به استقرار ریزقلمه‌های دو رقم جمال و چندلر در محیط‌کشت نشان داد که رقم، زمان تهیه ریزقلمه و شرایط محیط‌کشت و همچنین اثرات متقابل آن‌ها به‌جز اثر متقابل رقم و زمان تهیه ریزقلمه دارای اثر معنی‌داری در سطح یک درصد می‌باشد.

از نظر زمان تهیه ریزقلمه، نمونه‌گیری در اردیبهشت ماه دارای اختلاف معنی‌داری با نمونه‌گیری در تیر و شهریورماه از نظر صفات استقرار ریزقلمه، ارتفاع شاخه، تعداد شاخه، تعداد برگ و شاخص قهوه‌ای شدن ریزقلمه دارد. هرچند که استقرار ریزقلمه، تعداد برگ و شاخص قهوه‌ای شدن در تیرماه اختلاف معنی‌داری با شهریورماه داشت اما بین دو زمان تیر و شهریورماه اختلاف معنی‌داری از نظر ارتفاع شاخه و تعداد شاخه در ریزقلمه وجود نداشت. بررسی ارقام مورد مطالعه نشان داد که رقم چندلر از نظر استقرار ریزقلمه، ارتفاع شاخه، تعداد برگ و شاخص قهوه‌ای شدن اختلاف معنی‌داری با رقم جمال داشت (جدول ۲) اما دو رقم مورد بررسی از نظر صفت تعداد شاخه در ریزقلمه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

بررسی شرایط مختلف محیط‌کشت حاکی از آن است که در تیمارهای واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت و ذغال فعال، بیش‌ترین میزان استقرار (جدول ۲) و کم‌ترین شاخص قهوه‌ای شدن ریزقلمه مشاهده شد. در این دو تیمار سطح قهوه‌ای شده در هر ریزقلمه تقریباً کم‌تر از ۱۰ درصد (میانگین شاخص این تیمارها به‌ترتیب برابر با ۱/۰۰ و ۱/۲۵) و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. ارتفاع شاخه در ریزقلمه به‌ترتیب در تیمارهای واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت تاریکی و واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت بیش‌ترین مقدار را داشت و با سایر تیمارها به‌جز تیمار ذغال فعال اختلاف معنی‌داری داشتند. از نظر تعداد شاخه در ریزقلمه تیمارهای ۷۲ ساعت تاریکی، ذغال فعال و واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت به‌ترتیب بالاترین تعداد شاخه در ریزقلمه را داشتند. از نظر تعداد برگ در ریزقلمه تیمارهای واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت و واکشت

دو مرتبه هر ۷۲ ساعت بیشترین تعداد برگ را داشتند. تقریباً ریزقلمه در تیمارهای واکشت بعد از ۱۴۴ ساعت و شاهد در اکثر صفات، تیمار شاهد و تیمار ۲۴ ساعت تاریکی، کمترین مقادیر نسبت به سایر تیمارها و بالاترین شاخص قهوه‌ای شدن (جدول ۲).

جدول ۱: تیمارهای مورد استفاده در کشت درون شیشه‌ای رقم‌های گردوی ایرانی جمال و چندلر

Table 1: Treatments used for *in vitro* culture of Jamal and Chandler cultivars

تیمار Treatments	شرایط مختلف محیط کشت Different CULTURE CONDITIONS
1	شاهد (DKW محیط کشت پایه در شرایط اتاقک رشد) Control (DKW basal medium in growth chamber condition)
2	اضافه نمودن ذغال فعال (۲ گرم در لیتر) به محیط کشت پایه Adding activated charcoal (2g/l) to the basal medium
3	قرارگیری کشت‌ها ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی Placed culture 24 hours in a darkness conditions
4	قرارگیری کشت‌ها ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی Placed culture 72 hours in a darkness conditions
5	واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت Subculturing thrice every 24 hours
6	واکشت سه مرتبه هر ۷۲ ساعت Subculturing thrice every 72 hours
7	واکشت سه مرتبه هر ۱۴۴ ساعت Subculturing thrice every 144 hours

جدول ۲: تأثیر تیمارهای مختلف و سطوح آن‌ها روی برخی صفات ریزقلمه دو رقم جمال و چندلر

Table 2: Effect of different treatments and their levels on some traits of Jamal and Chandler cultivars

تیمار Treatment	سطوح تیمار Level of treatment	استقرار (درصد) Establishment (%)	طول شاخساره (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	تعداد شاخه Shoot number	تعداد برگ Leaf number	شاخص قهوه‌ای شدن Explant browning index
زمان تهیه ریزقلمه Time of sampling	اردیبهشت May	89.14 ^{a*}	3.62 ^a	2.89 ^a	8.61 ^a	1.07 ^c
	تیر July	66.86 ^b	3.14 ^b	2.14 ^b	6.39 ^b	2.39 ^b
	شهریور September	52.64 ^c	2.98 ^b	1.82 ^b	5.53 ^c	2.92 ^a
ارقام Cultivars	جمال Jamal	68.67 ^b	3.09 ^b	2.33 ^a	6.31 ^b	2.26 ^a
	چندلر Chandler	70.43 ^a	3.41 ^a	2.24 ^a	7.38 ^a	2.00 ^b
شرایط محیط کشت Culture conditions	شاهد Control	58.33 ^f	2.59 ^d	1.67 ^{de}	3.50 ^d	3.00 ^a
	ذغال فعال Activated charcoal	79.50 ^a	3.32 ^{bc}	2.75 ^{ab}	7.67 ^b	1.00 ^d
	۲۴ ساعت تاریکی 24h in darkness	61.50 ^e	2.80 ^d	1.50 ^e	5.83 ^c	2.50 ^b
	۷۲ ساعت تاریکی 72h in darkness	67.17 ^c	3.66 ^a	2.92 ^a	7.92 ^b	2.42 ^b
	واکشت ۲۴ ساعت Subculture thrice every 24h	80.17 ^a	3.73 ^a	2.75 ^{ab}	9.25 ^a	1.25 ^d
	واکشت ۷۲ ساعت Subculture thrice every 72h	74.67 ^b	3.49 ^{ab}	2.17 ^{cd}	8.58 ^{ab}	1.67 ^c
	واکشت ۱۴۴ ساعت Subculture thrice every 144h	65.50 ^d	3.15 ^c	2.25 ^{bc}	5.17 ^c	3.08 ^a

میانگین‌های هر ستون که دارای حرف یا حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر ندارند

Values followed by the same letter in each column are not significantly different ($P < 0.05$)

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به صفات ارتفاع شاخه تازه رشد یافته (جدول ۳) نشان داد که تیمارهای ۷۲ ساعت تاریکی و واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت بین دو رقم جمال و چندلر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما در سایر تیمارها

احتشام‌نیا و همکاران: تأثیر زمان تهیه ریزنمونه و شرایط محیط کشت بر...

ارتفاع شاخه‌های جدید در رقم چندلر نسبت به رقم جمال بیش‌تر و اختلاف معنی‌داری بین دو رقم وجود داشت. بیش‌ترین مقدار رشد شاخه جدید در تیمارهای واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت (۳/۸۳) و ۷۲ ساعت تاریکی (۳/۷۱) در رقم چندلر حاصل شد که البته رقم جمال هم در این دو تیمار رشد شاخه بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها داشتند. در بین تمامی تیمارها، میانگین ارتفاع شاخه تازه رشد یافته رقم چندلر (۳/۴۱) بیش‌تر از رقم جمال (۳/۰۹) بود و اختلاف معنی‌داری با رقم جمال داشت (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به صفت تعداد شاخه در هر ریزقلمه (جدول ۴) نشان داد که در تیمارهای شاهد و واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت تعداد شاخه در ریزقلمه رقم چندلر بیش‌تر از رقم جمال و اختلاف معنی‌داری

با آن داشت ولی تیمارهای ذغال فعال، ۷۲ ساعت تاریکی، واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت و واکشت بعد از ۱۴۴ ساعت سبب شد رقم جمال تعداد شاخه بیش‌تری در ریزقلمه نسبت به رقم چندلر داشته باشد و با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. در تیمار ۲۴ ساعت تاریکی، هر دو رقم کم‌ترین تعداد شاخه (۱/۵۰) را داشتند و تفاوتی بین دو رقم موردبررسی از نظر تعداد شاخه در ریزقلمه مشاهده نشد. بیش‌ترین تعداد شاخه در هر ریزقلمه در تیمارهای ۷۲ ساعت تاریکی و واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت در رقم جمال (۳/۰۰) حاصل شد. میانگین تعداد شاخه در هر ریزقلمه برای دو رقم نشان داد ارقام جمال (۲/۳۳) و چندلر (۲/۲۴)، اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد شاخه در هر ریزقلمه نداشت (جدول ۴).

جدول ۳: اثر متقابل رقم‌های مختلف گردو و شرایط مختلف کشت بر طول شاخساره ریزقلمه، ۳۰ روز پس از کشت

Table 3: Interaction between different walnut cultivar and medium conditions on microcutting shoot length, 30 day after culturing

تیمار Treatment	شاهد Control	ذغال فعال (۲) گرم در لیتر Activated charcoal	۲۴ ساعت تاریکی 24h in darkness	۷۲ ساعت تاریکی 72h in darkness	۲۴ ساعت واکشت Subculture thrice every 24h	۷۲ ساعت واکشت Subculture thrice every 72h	۱۴۴ ساعت واکشت Subculture thrice every 144h	میانگین رقم Means of cultivar
جمال Jamal	2.27±0.31 ^{b*}	3.17±0.42 ^b	2.65±0.34 ^b	3.62±0.45 ^a	3.62±0.48 ^b	3.45±0.30 ^a	2.85±0.33 ^b	3.09±0.38 ^b
چندلر Chandler	2.93±0.43 ^a	3.46±0.36 ^a	2.95±0.60 ^a	3.71±0.50 ^a	3.83±0.32 ^a	3.53±0.50 ^a	3.46±0.40 ^a	3.41±0.44 ^a

*: میانگین $\pm$ انحراف معیار. میانگین‌های هر ستون که دارای حرف یا حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر ندارند

*: Means SE $\pm$ Values followed by the same letter in each column are not significantly different (P<0.05)

جدول ۴: اثر متقابل رقم‌های مختلف گردو و شرایط مختلف کشت بر تعداد شاخه ریزقلمه، ۳۰ روز پس از کشت

Table 4: Interaction between different walnut cultivar and medium conditions on shoot number per microcuttings, 30 day after culturing

تیمار Treatment	شاهد Control	ذغال فعال (۲) گرم در لیتر Activated charcoal	۲۴ ساعت تاریکی 24h in darkness	۷۲ ساعت تاریکی 72h in darkness	۲۴ ساعت واکشت Subculture thrice every 24h	۷۲ ساعت واکشت Subculture thrice every 72h	۱۴۴ ساعت واکشت Subculture thrice every 144h	میانگین Mean
جمال Jamal	1.50±0.55 ^{b*}	2.83±0.75 ^a	1.50±0.55 ^a	3.00±0.63 ^a	3.00±0.63 ^a	1.83±0.75 ^b	2.67±0.82 ^a	2.33±0.67 ^a
چندلر Chandler	1.83±0.75 ^a	2.67±1.03 ^b	1.50±0.55 ^a	2.83±0.75 ^b	2.50±0.55 ^b	2.50±0.55 ^a	1.83±0.75 ^b	2.24±0.69 ^a

*: میانگین $\pm$ انحراف معیار. میانگین‌های هر ستون که دارای حرف یا حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر ندارند

*: Means SE $\pm$ Values followed by the same letter in each column are not significantly different (P<0.05)

جدول ۵: اثر متقابل رقم‌های مختلف گردو و شرایط مختلف کشت بر تعداد برگ ریزقلمه، ۳۰ روز پس از کشت

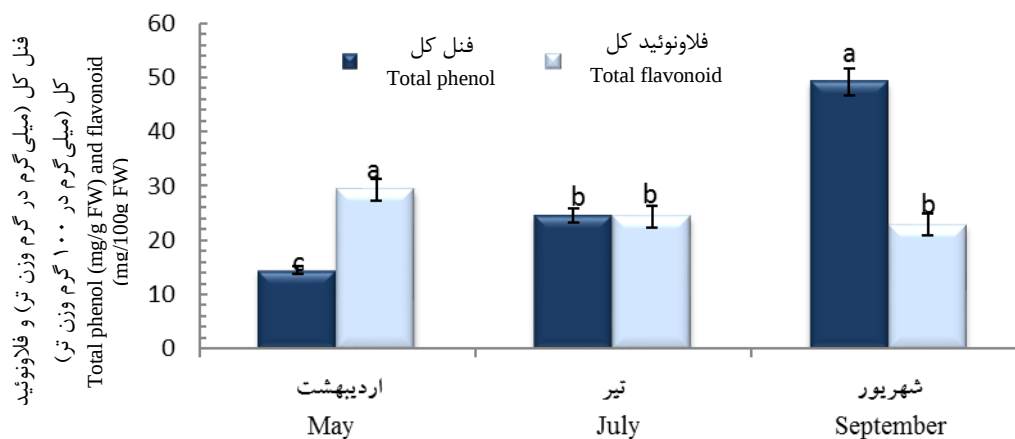
Table 5: Interaction between different walnut cultivar and medium conditions on leaf number per microcuttings, 30 day after culturing

میانگین رقم Means of cultivar	۱۴۴ ساعت واکشت Subculture thrice every 144h	۷۲ ساعت واکشت Subculture thrice every 72h	۲۴ ساعت واکشت Subculture thrice every 24h	۷۲ ساعت تاریکی 72h in darkness	۲۴ ساعت تاریکی 24h in darkness	ذغال فعال (۲ گرم در لیتر) Activated charcoal	شاهد Control	تیمار Treatment رقم Cultivar
۶.۳۱±۲.۱۲ ^b	۴.۳۳±۱.۶۳ ^b	۶.۸۳±۲.۹۹ ^b	۸.۸۳±۳.۱۹ ^b	۸.۰۰±۲.۰۰ ^a	۵.۳۳±۱.۵۱ ^b	۷.۵۰±۱.۷۶ ^b	۳.۳۳±۱.۷۵ ^{b*}	جمال Jamal
۷.۳۸±۱.۶۶ ^a	۶.۰۰±۲.۱۰ ^a	۱۰.۳۳±۳.۱۴ ^a	۹.۶۷±۱.۶۳ ^a	۷.۸۳±۱.۳۳ ^b	۶.۳۳±۱.۰۳ ^a	۷.۸۳±۱.۳۳ ^a	۳.۶۷±۱.۰۳ ^a	چندلر Chandler

*: میانگین ± انحراف معیار. میانگین‌های هر ستون که دارای حرف یا حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با

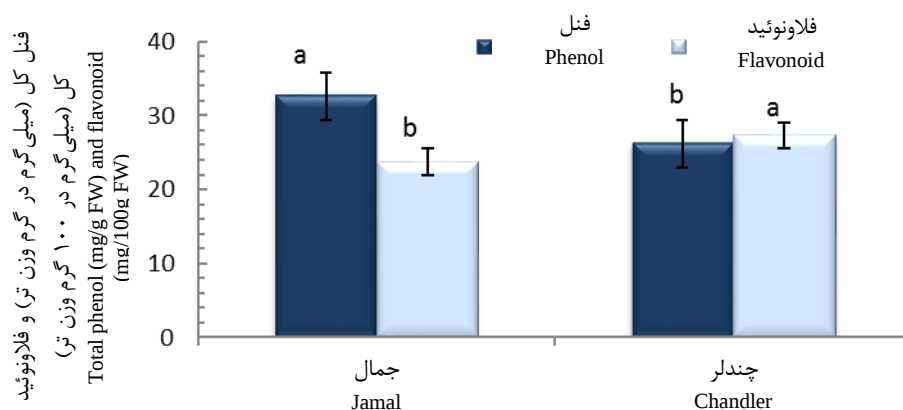
همدیگر ندارند

*: Means SE± Values followed by the same letter in each column are not significantly different (P<0.05)



شکل ۱: مقادیر فنل کل و فلاونوئید کل شاخه رشد سالجاری دو رقم گردو در ماه‌های مختلف

Fig. 1: Values of total phenol and flavonoid of current year growth shoot of two walnut cultivars on different month



شکل ۲: مقادیر فنل کل و فلاونوئید کل شاخه رشد سالجاری دو رقم گردو

Fig. 2: Values of total phenol and flavonoid of current year growth shoot of two walnut cultivars

احتشام‌نیا و همکاران: تأثیر زمان تهیه ریزنمونه و شرایط محیط کشت بر ...

جدول ۶: اثر متقابل رقم، زمان تهیه ریزقلمه و شرایط مختلف محیط کشت در تیمارهای شاهد، ذغال فعال و واکشت ۳ مرتبه هر ۲۴ ساعت روی برخی صفات ریزقلمه

Table 6: Intraction between cultivar, time of sampling and different culture conditions of control, activated charcoal andubculture thrice every 24 hours treatments on some traits of microcuttings

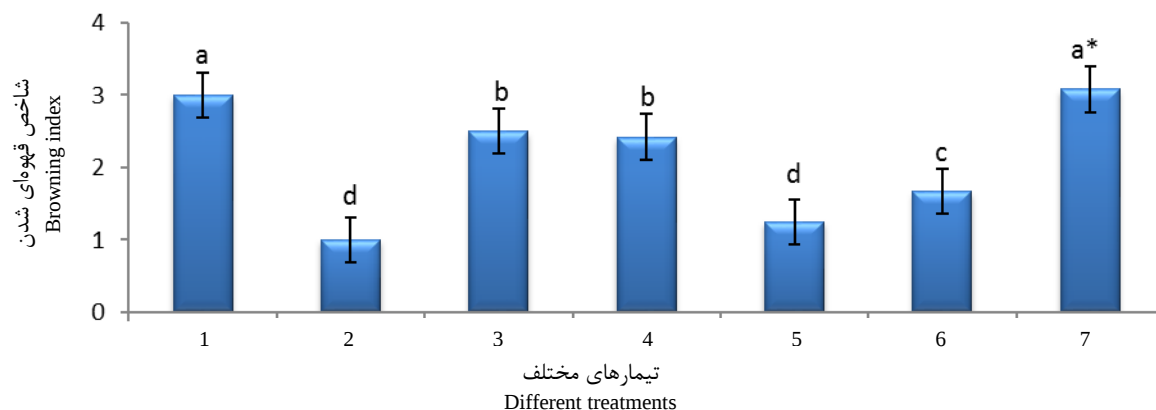
تعداد برگ Leaf number	تعداد شاخه Shoot number	طول شاخساره (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	شاخص قهوه‌ای شدن Explant browning index	استقرار (درصد) Establishment (%)	تیمار Treatment
5.50 ^{de}	2.00 ^{bc}	2.57 ^f	1.50 ^{cd}	81.00 ^{b*}	جمال × اردیبهشت × شاهد Jamal × May × Control
2.50 ^f	1.50 ^c	2.26 ^f	4.00 ^a	51.00 ^d	جمال × تیر × شاهد Jamal × July × Control
2.00 ^f	1.00 ^{cd}	1.97 ^g	4.00 ^a	40.00 ^e	جمال × شهریور × شاهد Jamal × September × Control
8.50 ^b	3.50 ^a	3.66 ^b	0.00 ^e	95.00 ^a	جمال × اردیبهشت × ذغال فعال Jamal × May × Activated ch.
7.00 ^c	2.50 ^b	2.96 ^d	1.00 ^d	79.00 ^b	جمال × تیر × ذغال فعال Jamal × July × Activated ch.
7.00 ^c	2.50 ^b	2.89 ^d	2.00 ^c	65.00 ^c	جمال × شهریور × ذغال فعال Jamal × September × Activated ch.
12.00 ^a	3.50 ^a	4.07 ^a	0.50 ^{ed}	99.00 ^a	جمال × اردیبهشت × واکشت ۳ مرتبه Jamal × May × Thrice subculture.
8.50 ^b	3.00 ^{ab}	3.61 ^b	1.50 ^{cd}	83.00 ^b	جمال × تیر × واکشت ۳ مرتبه Jamal × July × Thrice subculture
6.00 ^d	2.50 ^b	3.18 ^c	2.50 ^{bc}	57.00 ^{cd}	جمال × شهریور × واکشت ۳ مرتبه Jamal × September × Thrice subculture
5.00 ^e	2.50 ^b	3.39 ^c	1.50 ^{cd}	81.00 ^b	چندلر × اردیبهشت × شاهد Chandler × May × Control
3.00 ^f	1.50 ^c	2.71 ^e	3.00 ^b	53.00 ^d	چندلر × تیر × شاهد Chandler × July × Control
3.00 ^f	1.50 ^c	2.67 ^e	4.00 ^a	44.00 ^e	چندلر × شهریور × شاهد Chandler × September × Control
9.50 ^b	3.50 ^a	3.90 ^{ab}	0.00 ^e	97.00 ^a	چندلر × اردیبهشت × ذغال فعال Chandler × May × Activated ch.
7.00 ^c	2.50 ^b	3.32 ^c	1.00 ^d	81.00 ^b	چندلر × تیر × ذغال فعال Chandler × July × Activated ch.
7.00 ^c	2.00 ^{bc}	3.17 ^c	2.00 ^c	60.00 ^{cd}	چندلر × شهریور × ذغال فعال Chandler × September × Activated ch.
11.00 ^{ab}	3.00 ^{ab}	4.09 ^a	0.00 ^e	99.00 ^a	چندلر × اردیبهشت × واکشت ۳ مرتبه Chandler × May × Thrice Subculture
9.50 ^b	2.50 ^b	3.64 ^b	1.00 ^d	80.00 ^b	چندلر × تیر × واکشت ۳ مرتبه Chandler × July × Thrice Subculture
8.50 ^{bc}	2.00 ^{bc}	3.75 ^b	2.00 ^c	63.00 ^c	چندلر × شهریور × واکشت ۳ مرتبه Chandler × September × Thrice Subculture

*: میانگین‌های هر ستون که دارای حرف یا حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر ندارند.

*: Values followed by the same letter in each column are not significantly different (P<0.05). Activated ch.= Activated charcoal

تاریکی اختلاف معنی‌داری در تعداد برگ در ریزقلمه بین دو رقم مشاهده نگردید. بیش‌ترین تعداد برگ در ریزقلمه رقم چندلر و در تیمار واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت (۱۰/۳۳) به‌دست آمد. تعداد برگ در هر شاخه در بین تمامی تیمارها، در رقم چندلر (۷/۳۸) بیش‌تر از رقم جمال (۶/۳۱) بود و اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (جدول ۵).

نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به صفت تعداد برگ در ریزقلمه (جدول ۵) نشان داد که به‌جز تیمار ۷۲ ساعت تاریکی که رقم جمال تعداد برگ در ریزقلمه بیش‌تری از رقم چندلر دارد، در سایر تیمارها شامل شاهد، ذغال فعال، ۲۴ ساعت تاریکی، واکشت هر ۲۴، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت رقم چندلر تعداد برگ بیش‌تری در ریزقلمه نسبت به رقم جمال دارد و اختلاف معنی‌داری بین دو رقم وجود دارد. در تیمار ۷۲ ساعت

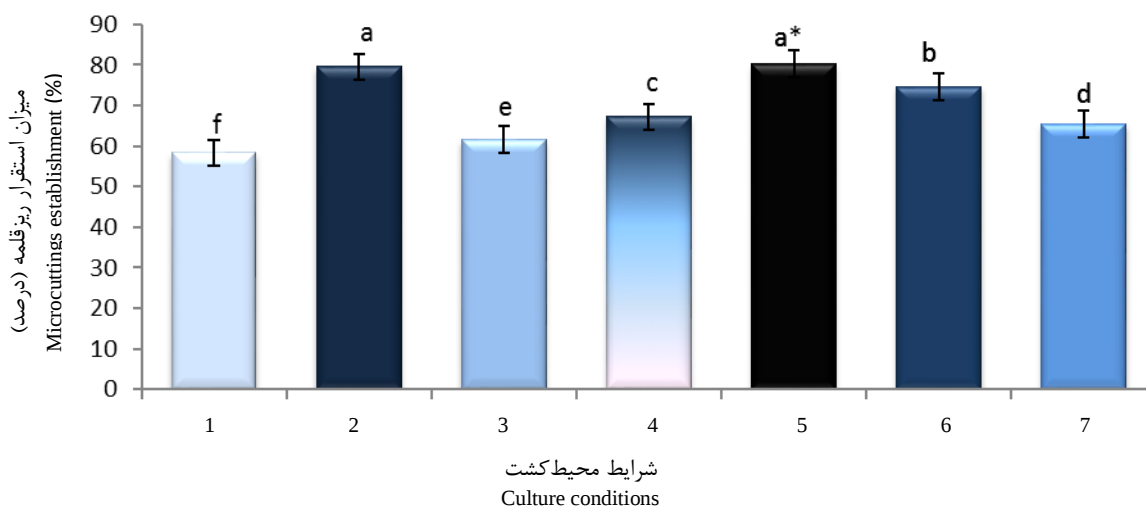


شکل ۳: شاخص قهوه‌ای شدن ریزقلمه در شرایط مختلف محیط کشت (تیمارهای مختلف). ۰: بدون علائم قهوه‌ای شدن، ۱: سطح قهوه‌ای شده کمتر از ۱۰ درصد، ۲: سطح قهوه‌ای شده ۱۰-۲۵ درصد، ۳: سطح قهوه‌ای شده ۲۵-۵۰ درصد، ۴: سطح قهوه‌ای شده بیش از ۵۰ درصد. تیمارها به ترتیب: ۱: شاهد، ۲: دغال فعال، ۳: ۲۴ ساعت تاریکی، ۴: ۷۲ ساعت تاریکی، ۵: واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، ۶: واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت و ۷: واکشت یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت

*: میانگین‌هایی که دارای حرف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر ندارند

Fig. 3: Microcuttings browning index in different culture conditions (different treatments). 0=without browning symptoms, 1: browning area 10-25%, 2: browning area 25-50%, 3: browning area more than 50%. Treatments: 1: control, 2: activated charcoal, 3: 24h in darkness, 4: 72h in darkness, 5: subculture thrice every 24 hours, 6: subculture thrice every 72 hours and 7: subculture thrice every 144 hours.

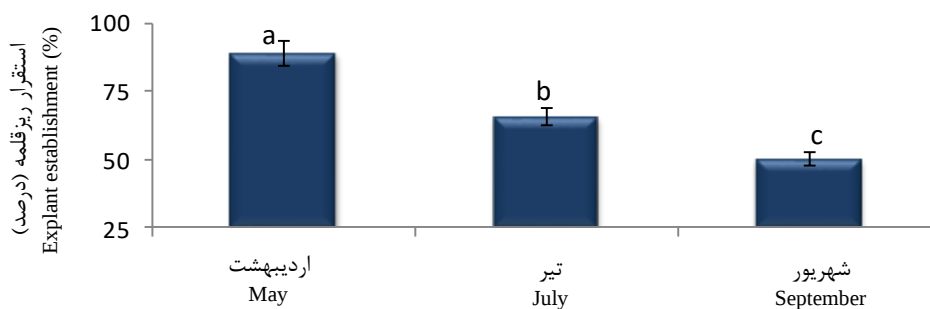
*: Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$)



شکل ۴: تأثیر تیمار شرایط مختلف محیط کشت در استقرار ریزقلمه دو رقم چنادر و جمال. تیمارها به ترتیب: ۱: شاهد، ۲: دغال فعال، ۳: ۲۴ ساعت تاریکی، ۴: ۷۲ ساعت تاریکی، ۵: واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، ۶: واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت و ۷: واکشت یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت

Fig. 4: Effect of different culture conditions on two walnut cultivars microcuttings establishment. Treatments: 1: control, 2: activated charcoal, 3: 24h in darkness, 4: 72h in darkness, 5: subculture thrice every 24 hours, 6: subculture thrice every 72 hours and 7: subculture thrice every 144 hours

احتشام‌نیا و همکاران: تأثیر زمان تهیه ریزنمونه و شرایط محیط کشت بر...



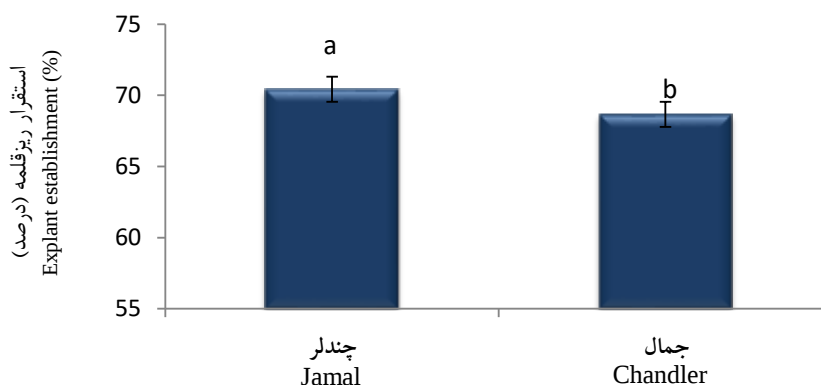
شکل ۵: تأثیر زمان تهیه ریزقلمه در استقرار ریزقلمه دو رقم چندلر و جمال در محیط کشت

Fig. 5: Effect of time of sampling on microcuttings establishment of two walnut cultivars in medium.



شکل ۶: استقرار ریزقلمه رقم جمال در شرایط مختلف محیط کشت. تیمارها به ترتیب: ۱: شاهد، ۲: ذغال فعال، ۳: ۲۴ ساعت تاریکی، ۴: ۷۲ ساعت تاریکی، ۵: واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، ۶: واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت و ۷: واکشت یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت

Fig. 6: Establishment of Jamal microcutting on different culture conditions. Treatments: 1: control, 2: activated charcoal, 3: 24h in darkness, 4: 72h in darkness, 5: subculture thrice every 24 hours, 6: subculture thrice every 72 hours and 7: subculture thrice every 144 hours



شکل ۷: استقرار ریزقلمه دو رقم چندلر و جمال در محیط کشت تحت تأثیر تیمارهای مختلف

Fig. 7: Microcutting establishment of two walnut cultivars in medium affected different treatments

بود و اختلاف آن‌ها معنی‌دار بود. از طرف دیگر، فلاونوئید کل شاخه در اردیبهشت‌ماه (۲۹/۳۵) بالاترین مقدار را داشت و اختلاف معنی‌داری با تیر و شهریورماه داشت اما بین مقادیر فلاونوئید کل در تیر (۲۴/۳۵) و شهریورماه (۲۲/۸۵) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

هم‌چنین، بررسی مقادیر فنل و فلاونوئید کل شاخه یک‌ساله ارقام (شکل ۲) نشان داد که مقادیر فنل و فلاونوئید کل نیز تحت تأثیر ارقام قرار دارد و رقم جمال (۳۲/۶) مقدار فنل کل

بررسی مقادیر فنل و فلاونوئید کل شاخه یک‌ساله طی ماه‌های مختلف نمونه‌گیری در این مطالعه (اردیبهشت، تیر و شهریور) نشان داد که میزان فنل کل به‌طور واضحی تحت تأثیر زمان نمونه‌گیری قرار دارد (شکل ۱). مقادیر فنل کل در ماه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با هم داشت به‌طوری‌که در اردیبهشت‌ماه (۱۴/۴) کم‌ترین مقدار فنل کل شاخه به‌دست آمد که نسبت به ماه‌های تیر و شهریور مقدار کم‌تری داشت. مقدار فنل کل در شهریورماه (۴۹/۲) بیش‌تر از تیرماه (۲۴/۵۵)

درصد) سبب استقرار بالای ریزقلمه در محیط کشت خواهد شد و اختلاف معنی داری با سایر تیمارها دارند. تیمار شاهد (۵۸/۳۳ درصد) کمترین میزان استقرار ریزقلمه را نسبت به سایر تیمارها داشت (شکل ۴).

بررسی اثر متقابل رقم، زمان تهیه ریزقلمه و شرایط محیط کشت در تیمارهای شاهد، ذغال فعال و واکشت ۳ مرتبه هر ۲۴ ساعت (جدول ۶) که برای مقایسه بیشترین (ذغال فعال و واکشت ۳ مرتبه هر ۲۴ ساعت) و کمترین استقرار (شاهد) آمده نشان داد که به طور کلی در نمونه گیری اردیبهشت ماه بیشترین میزان استقرار، ارتفاع شاخه، تعداد شاخه و تعداد برگ و در مقابل کمترین شاخص قهوه ای شدن ارقام جمال و چندلر در تیمارهای واکشت ۳ مرتبه و ذغال فعال به دست آمد و در نمونه گیری شهریور ماه و سپس تیر ماه به ترتیب کمترین میزان استقرار، ارتفاع شاخه، تعداد شاخه و تعداد برگ و بیشترین شاخص قهوه ای شدن ارقام جمال و چندلر در تیمار شاهد حاصل شد.

نتایج همبستگی بین صفات مورد بررسی نشان داد (جدول ۷) که شاخص قهوه ای شدن ریزقلمه رابطه منفی و معنی داری در سطح یک درصد با دیگر صفات مورد بررسی در این مطالعه دارد. شاخص قهوه ای شدن با میزان استقرار ریزقلمه همبستگی منفی و معنی دار قابل توجهی (به ترتیب ۰/۸۶۲-) داشت. همچنین صفت ارتفاع شاخه با تعداد برگ رابطه مثبت و معنی دار بالایی (۰/۷۵۲) داشت. بین دیگر صفات نیز رابطه مثبت نسبتاً بالایی و معنی داری (بالتر از ۰/۵) در سطح یک درصد مشاهده گردید (جدول ۷).

شاخه بیشتری از رقم چندلر (۲۶/۲) داشت و بالعکس مقدار فلاونوئید کل شاخه در رقم چندلر (۲۷/۲۵) بالاتر از رقم جمال (۲۳/۷۵) بود.

نتایج بررسی شاخص قهوه ای شدن ریزقلمه در شرایط مختلف محیط کشت (شکل ۳) نشان داد که به ترتیب شاخص قهوه ای شدن از کم به زیاد در تیمارهای ذغال فعال، واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت، ۷۲ ساعت تاریکی، ۲۴ ساعت تاریکی، شاهد و واکشت یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت مشاهده شد. کمترین میزان قهوه ای شدن در ریزقلمه های کشت شده در محیط کشت حاوی ذغال فعال و واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت مشاهده شد که اختلاف معنی داری با هم نداشتند. در این دو تیمار سطح قهوه ای شده در هر ریزقلمه تقریباً کم تر از ۱۰ درصد (میانگین شاخص این تیمارها به ترتیب برابر با ۱/۰۰ و ۱/۲۵) را نشان دادند و اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشتند. در تیمارهای شاهد و واکشت یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت تقریباً سطح قهوه ای شده هر ریزقلمه در محیط کشت بین ۵۰-۲۵ درصد (میانگین شاخص این تیمارها به ترتیب ۳/۰۰ و ۳/۰۸) می باشد و اختلاف معنی داری با سایر تیمارها دارند.

نتایج مقایسه میانگین میزان استقرار ریزقلمه در محیط کشت (شکل ۴) نشان داد که به ترتیب تیمارهای ذغال فعال، واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت، واکشت دو مرتبه هر ۷۲ ساعت، ۷۲ ساعت تاریکی، واکشت یک مرتبه بعد از ۱۴۴ ساعت، ۲۴ ساعت تاریکی و شاهد بیشترین میزان استقرار را داشتند. نتایج نشان داد که تیمار واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت (۸۰/۱۷ درصد) و اضافه نمودن ذغال فعال (۷۹/۵۰)

جدول ۷: همبستگی ویژگی های مختلف کشت درون شیشه ای رقم های گردوی جمال و چندلر

Table 7: Correlation between different traits on *in vitro* establishment of two walnut cultivars; Jamal and Chandler

تعداد برگ Leaf number	تعداد شاخه Shoot number	طول شاخساره (سانتی متر) Shoot length (cm)	شاخص قهوه ای شدن Browning index	استقرار Establishment
-	-	-	-	-
-	-	-	-0.862**	استقرار Establishment
-	-	-	-	شاخص قهوه ای شدن Browning index
-	-	-	0.657**	طول شاخساره (سانتی متر) Shoot length (cm)
-	-	0.641**	-0.615**	تعداد شاخه Shoot number
-	0.563**	0.752**	-0.718**	تعداد برگ Leaf number

***: ضریب همبستگی بین دو صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار است

***: Correlation coefficient significant between two traits at 1%.

بحث

توانسته اند پتانسیل متفاوتی از نظر استقرار ریزقلمه گردو در محیط کشت داشته باشند. بر این اساس، زمان تهیه ریزقلمه تأثیر واضح و آشکاری در استقرار موفق ریزقلمه در محیط کشت

نتایج پژوهش حاضر، حاکی از آنست که تیمارهای مورد بررسی شامل ارقام، زمان تهیه ریزقلمه و شرایط مختلف محیط کشت

داشت (شکل ۵). میزان قهوه‌ای شدن بافت بستگی به فاکتورهای متعدد قبل و پس از تهیه ریزنمونه (مارین و همکاران، 1993؛ بیس و آلدوینکل، 1994؛ مادگیل و همکاران، 1999؛ دابرانسکی و همکاران، 2000a؛ کاوشال و همکاران، 2005؛ یاری و همکاران، ۱۳۹۰) و فصل جمع‌آوری نمونه دارد (سولار و همکاران، 2006؛ جاکوپیک^۱ و همکاران، 2007؛ کاسمولسکو^۲ و همکاران، 2010؛ دابرانسکی و تکزیرا/داسیلوا، 2010). در مطالعه یاری و همکاران (۱۳۹۰) ریزنمونه‌های تک گره گردو در نمونه‌گیری ابتدای فصل رشد استقرار بهتری داشتند که با نتایج پژوهش حاضر در مورد تهیه ریزقلمه در روزهای اولیه شکوفایی جوانه‌های درخت در فصل بهار (اردیبهشت ماه) مطابقت دارد. میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه در محیط کشت تحت تأثیر زمان تهیه ریزنمونه و مرتبط با محتوی فنل کل ریزنمونه قرار می‌گیرد که البته محتوی فنل و فلاونوئید کل تحت تأثیر پارامترهای اکولوژیکی سال موردبررسی و ژنوتیپ نیز می‌باشد. گزارش شده است که تغییرات فصلی بر روی پدیده قهوه‌ای شدن در محیط کشت تأثیرگذار است (بیئدرمن^۳، 1987؛ ونگ^۴ و همکاران، 1994). در پژوهش حاضر، ریزقلمه‌های تهیه شده در اردیبهشت ماه، کم‌ترین محتوی فنل کل (شکل ۱)، بیش‌ترین استقرار و کم‌ترین شاخص قهوه‌ای شدن (جدول ۲) را در شرایط مختلف محیط کشت نسبت به ریزقلمه‌های تهیه شده در ماه‌های تیر و شهریور داشتند. بنظر می‌رسد بیوسنتز ترکیبات فنلی در شروع فصل رشد در کم‌ترین مقدار است و با افزایش تابش نور خورشید و گرم شدن هوا و افزایش رشد رویشی و توسعه شاخ و برگ در خرداد و تیر ماه به‌سرعت محتوی ترکیبات فنلی درخت بالا می‌رود و با شروع توسعه سریع میوه در مردادماه، زمانی که مواد غذایی و فتوآسیمیلات‌ها برای رشد میوه مورد نیاز است، این ترکیبات در میوه‌ها تجمع می‌یابند (چارلت و ژرماین^۵، 1988) و دوباره در شهریورماه، مقادیر این ترکیبات در شاخه و برگ درخت افزایش می‌یابد. بنابراین توصیه می‌شود که ریزقلمه‌ها زمانی تهیه شوند که محتوی فنلی بافت شاخه در حداقل مقدار خود باشد.

کاسمالسکو و ترندافیر^۶ (2011) در مطالعه‌ای که به بررسی تغییرات فصلی فنل کل در برگ‌های درخت گردو پرداخته شده، نشان دادند که محتوی فنل کل برگ گردو در ماه جولای (حدود تیرماه) و اوایل سپتامبر (حدود شهریورماه) مقادیر

بالتری در مقایسه با ماه آگوست (حدود مردادماه) دارد که این نتایج، با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. همچنین، پیشنهاد شده است که محتوی فلاونوئیدی مرتبط با تابش خورشید است زیرا که نقش آن‌ها به‌عنوان فیلترهای نوری، ممکن است افزایش آن‌ها را هم در ابتدای فصل رشد جهت محافظت جوانه‌ها تازه شکوفا شده از تابش و همچنین ماه جولای در اوج تابش را توجیه نماید (جلیلی و صادقی‌زاده^۷، 2012).

مادگیل و همکاران (1999) با مطالعه تأثیر زمان تهیه ریزنمونه‌های سیب بر قهوه‌ای شدن در محیط کشت گزارش نمودند که تهیه ریزنمونه در فصل بهار و فصل تابستان سبب قهوه‌ای شدن کمتر ریزنمونه‌ها خواهد شد و با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر شاخص قهوه‌ای شدن کم‌تر در اردیبهشت‌ماه (جدول ۲) هم‌خوانی دارد ولی در تابستان این شاخص در نمونه‌های موردبررسی در این مطالعه افزایش یافت که با این نتایج مطابقت ندارد. این درحالی است که دابرانسکی و همکاران (2000a) نیز با تحقیق بر روی زمان تهیه ریزنمونه‌های سیب دریافتند که تهیه ریزنمونه در فصل زمستان و فصل بهار سبب تلفات بالای ریزنمونه و استقرار کم‌تر خواهد شد که با نتایج تحقیق حاضر در خصوص استقرار بالاتر ریزقلمه در نمونه‌گیری اردیبهشت‌ماه (جدول ۲) تطابق ندارد. همچنین، مطالعات قبلی نشان داده که زمانی که ریزنمونه‌ها در فصل بهار یا تابستان تهیه شود آلودگی ریزنمونه در مقایسه با تهیه ریزنمونه در پاییز و زمستان به مراتب کم‌تر است (هاتشینسون^۸، 1984؛ وبستر و جونز، 1991؛ مادگیل و همکاران، 1999). مشاهدات ما در این پژوهش، با نتایج مطالعات قبلی در مورد افزایش محتوی فنل بافت طی فصل رشد و افزایش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و میزان بالای قهوه‌ای شدن هم‌خوانی دارد (بیئدرمن، 1987؛ ونگ و همکاران، 1994 و دابرانسکی و تکزیرا/داسیلوا، 2010). بنابراین، پیشنهاد می‌شود ریزقلمه در همان روزهای آغازین شکوفایی جوانه از درخت تهیه گردد.

گزارشات متعددی مبنی بر تأثیر مثبت ذغال فعال در مراحل اولیه شروع کشت ریزنمونه در محیط کشت بسیاری از گیاهان و درختان میوه ارائه شده است (کوریر^۹ و همکاران، 1986؛ بیس و آلدوینکل، 1994؛ شارما^{۱۰} و همکاران، 2000؛ دابرانسکی و همکاران، 2000a,b,c؛ ایدریس^{۱۱} و همکاران، 2006؛ توماس^{۱۲}، 2008). به‌نظر می‌رسد که ذغال فعال در جذب مواد فنلی با ایجاد محیط تاریک مشابه شرایط خاک

7. Jalili and Sadeghzade

8. Hutchinson

9. Curir

10. Sharma

11. Idris

12. Thomas

1. Jakopic

2. Cosmulescu

3. Biedermann

4. Wang

5. Charlot and Germain

6. Cosmulescu and Trandafir

است. تاریکی سبب جلوگیری از افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در پدیده قهوه‌ای شدن ریزنمونه خواهد شد. هرچند تحقیقات مشابه حاکی از تأثیر مثبت یا تأثیر کم تیمار تاریکی در استقرار کشت‌ها است (پیپر و زیمر^۸، ۱۹۷۶؛ پیت و مانکوزین^۹، ۱۹۸۱؛ یدریس و همکاران، ۲۰۰۶).

در طرف دیگر هرچند اختلاف دو رقم موردبررسی در این پژوهش از نظر میزان استقرار ریزقلمه به لحاظ آماری معنی‌دار است اما با توجه به این‌که درصد استقرار ریزقلمه‌های رقم چندلر و رقم جمال نزدیک است بایستی ارقام بیش‌تری را برای درک بهتر روابط و تأثیر رقم بر روی استقرار و قهوه‌ای شدن ریزقلمه مورد مطالعه و بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که برای استقرار بهتر ریزقلمه‌های گونه‌های دارای ترکیبات فنلی زیاد مانند گردو، گام اول موفقیت بستگی به زمان تهیه ریزقلمه دارد. کارآیی تیمارهای اعمال شده در این مطالعه، بستگی به زمان تهیه ریزقلمه داشت و در اغلب موارد کنترل موفق قهوه‌ای شدن با ترکیبی از تیمارها و رقم مناسب حاصل شد. تهیه نمونه در شرایط آب و هوایی استان همدان (شهرستان توپسرکان) در اردیبهشت‌ماه، در شرایط واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت و اضافه نمودن ذغال فعال بهترین نتایج را در استقرار ریزقلمه-های تک‌گروه دو رقم چندلر و جمال داشت. محتوی فنل ریزقلمه در زمان تهیه نمونه در اردیبهشت‌ماه در حداقل مقدار است و با کشت ریزقلمه در محیط‌کشت، تراوش ترکیبات فنلی به درون محیط‌کشت آغاز و به مرور این ترکیبات در محیط‌کشت انباشته خواهند شد. واکشت پی‌درپی و اضافه کردن ذغال فعال به‌ترتیب از طریق از دسترس خارج ساختن این ترکیبات یا بلوکه و جذب کردن آن‌ها، از تجمع ترکیبات فنلی در محیط‌کشت که سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو، اکسید شدن این ترکیبات و نهایتاً قهوه‌ای شدن ریزقلمه می‌شوند، ممانعت به‌عمل می‌آورند.

سپاسگزاری

از ریاست محترم مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان همدان، هم‌چنین مسئول محترم ایستگاه تحقیقات گردوی توپسرکان آقای بختیاری، به پاس همکاری‌های صمیمانه جهت تأمین نمونه‌های گیاهی، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

(داماس و مونتیسوس، ۱۹۹۵) و غیرفعال کردن پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز سبب بقاء و استقرار ریزنمونه در محیط‌کشت و اندام‌زایی آن خواهد شد (پن و ون/ستدن^۱، ۱۹۹۸؛ نگلین^۲ و همکاران، ۲۰۰۷؛ توماس، ۲۰۰۸). نتایج تحقیق آشاتوش و همکاران (۲۰۰۳) که به بررسی ارتباط تراوش ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه در کشت بافت انار پرداختند، نشان داد که واکشت ریزنمونه‌ها سه مرتبه، سبب کنترل قهوه‌ای شدن در مقایسه با کاربرد ذغال فعال و اسید اسکوربیک شده است. در مطالعه حاضر نیز واکشت سه مرتبه هر ۲۴ ساعت سبب استقرار بالا و کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه شده است که با نتایج پژوهش ذکر شده مطابقت دارد. هم‌چنین در بسیاری از مطالعات واکشت پی‌درپی ریزنمونه سبب استقرار بهتر آن در محیط‌کشت شده است (درایور و کونیایکی، ۱۹۸۴؛ کوریر و همکاران، ۱۹۸۶؛ پیتریک، ۱۹۸۷؛ ریویلا^۳ و همکاران، ۱۹۸۹؛ مک‌گراناهان، ۱۹۸۸؛ پریسی^۴ و همکاران، ۱۹۸۹؛ لسی و مک‌گراناهان^۵، ۱۹۹۲؛ روت و همکاران، ۱۹۹۹).

گزارش شده است که نور سبب افزایش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز و سبب قهوه‌ای شدن ریزنمونه می‌شود (پن و ون/ستدن، ۱۹۹۸؛ ونگ و همکاران، ۱۹۹۴؛ لینینگتن^۶، ۱۹۹۱). احتشام‌نیا و همکاران (۱۳۹۲) با پوشاندن شاخه (ایجاد تاریکی شاخه بر روی پایه مادری) درخت گردو قبل از شروع فصل رشد به‌مدت دو ماه با پوشش‌های مختلف دریافتند که پوشاندن شاخه، بر محتوی فنل کل و فلاونوئید کل شاخه برخی ارقام مطالعه شده تأثیرگذار است. نتایج این مطالعه، نشان داد که کم‌ترین مقدار فنل و فلاونوئید کل شاخه در ارقام با استفاده از پوشش پارچه سفید به‌دست آمد و استفاده از پوشش پلی‌اتیلن سیاه تأثیری در کاهش محتوی فنل کل شاخه نداشت ولی مقدار فلاونوئید کل شاخه را در مقایسه با شاهد کاهش داد. مطالعات دیگر، نشان داده است که مدت بهینه تیمار تاریکی در مرحله ابتدایی شروع کشت در محیط‌کشت بستگی به گونه گیاهی دارد (زیو و ها/لوی^۷، ۱۹۸۳؛ ونگ و همکاران، ۱۹۹۴). در مطالعه حاضر، تیمار ۷۲ ساعت تاریکی نتایج بهتری از تیمار ۲۴ ساعت تاریکی در کنترل قهوه‌ای شدن و استقرار ریزقلمه در محیط‌کشت داشته است هرچند این تیمارها نسبت به برخی تیمارها تأثیر کم‌تر و نسبت به تیمار شاهد تأثیر بیش‌تری در استقرار ریزقلمه در محیط‌کشت داشته

1. Pan and van Staden
2. Nguyen
3. Revilla
4. Preece
5. Leslie and McGranahan
6. Linington
7. Ziv M and Halevy

8. Pieper and Zimmer
9. Pittet and Moncousin

- احتشام‌نیا، ع.، غلامی، م. و اثنی عشری، م. ۱۳۹۲. تأثیر استفاده از پوشش‌های مختلف شاخه برخی ارقام گردو (*Juglans regia* L.) بر محتوی فنل و فلاونوئید کل. مجموعه مقالات هشتمین کنگره علوم باغبانی ایران. صفحه ۴۲۹-۴۲۸.
- یاری، م. ب.، غلامی، م. و اثنی عشری، م. ۱۳۹۰. اثر زمان نمونه‌گیری، نوع و آرایش کشت ریزنمونه‌ها و نوع آنتی‌اکسیدان بر استقرار و رشد ریزنمونه‌های گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه‌ای. نشریه علوم باغبانی ایران، ۴۲ (۲): ۱۴۹-۱۴۱.
- Abdul-Kader, A. M., Mathe, A. and Laszloffy, K. 1991. Aspects of the in vitro technology of apple (*Malus* sp.). Acta Agronomica Hungarica, 40: 237-51.
- Amaral, J. S., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valentao, P., Pereira, J. A. and Ferreres, F. 2004. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. Food Chemistry, 88: 373-379.
- Ashutosh, A. Shanti, M. and Mayakumari, P. 2003. Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. Journal of Agriculture Science, 23 (1): 29-31.
- Bhat, S. R. and Chandel, K. P. J. 1991. Plant Cell Reports, 10: 358-361.
- Biedermann, I. E. C. 1987. Factors affecting establishment and development of Magnolia hybrids in vitro. Acta Horticulture, 212: 625-629.
- Charlot, G. and Germain, E. 1988. Le Noyer Nouvelles Techniques. Paris: Ctifl.
- Cheng, T. Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of douglas fir (*Pseudotsuga menziensis* Mirb, Franco). Journal of Plant Science, 5: 97-102.
- Corduk, N. and Aki, C. 2011. Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana* bornm, an endemic medicinal herb of Turkey. Romanian Biotechnological Letters, 16 (6): 6760-6765.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G., Botu, M., Baci, A. and Gruia, M. 2010. Phenolics of green husk in mature walnut fruits. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, 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.
- Curir, P., Damiano, C. and Cosmi, T. 1986. In vitro propagation of some rose cultivars. Acta Horticulture, 189: 221-224.
- Dobránszki, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámor-Benczúr, E., Bubán, T. and Szalai, J. 2000a. In vitro shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. International Journal of Horticulture Science, 6: 36-39.
- Dobránszki, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tábori, K., Jámor-Benczúr, E., Bubán, T. and Szalai, J. 2000b. Single and dual effects of different cytokinins on shoot multiplication of different apple scions. International Journal of Horticulture Science, 6: 76-78.
- Dobránszki, J., Magyar-Tábori, K., Jámor-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. International Journal of Horticulture Science, 6: 84-87.
- Dobránszki, J. and Teixeira, J. A. 2010. Micropropagation of apple. Journal of Biotechnology Advances, 28: 462-488.
- Driver, J. A. and Kuniyuki, A. H. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. Horticulture Science, 19: 507-509.
- Dumas, E. and Monteuis, O. 1995. In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature Pinus pinaster explants-influence of activated charcoal. Plant Cell Tissue Organ Culture, 40: 231-5.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ehteshamnia, A., Mohammad Nabavi, S., Fazel Nabavi, S., Ali Ebrahimzadeh, M. and Pourmorad, F. 2011. Influence of environmental factors on antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. Journal of Medicen. Plants Research, 5 (7): 1128-1133.
- Hutchinson, J. F. 1984. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple Northern Spy. Scientia Horticulture, 22: 347-58.
- Idris, T. I. M. and Mahdi, E. M. 1996. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) by tissue culture. University of Khartoum Journal of Agriculture Science, 4 (2): 104-116.
- Idris, T. I. M. Mahdi, E. M. and Said, A. E. 2006. Enhancement of growth and control of browning of tissue cultures of guava (*Psidium guajava* L.). Journal of Science Technology, 7 (1): 1-10.
- Jakopic, J., Colaric, M., Veberic, R., Hudina, M., Solar, A. and Stampar, F. 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur? Food Chemistry, 104 (1): 100-105.
- Jalili, A. and Sadeghzade, A. 2012. Total phenolics content and phenolic profile of walnut (*Juglans regia* L.) Leaves in different cultivars grown in Iran. International Research Journal of Biotechnology, 3 (1): 010-017.
- Karhu, S. T. and Zimmerman, R. H. 1993. Effect of light and coumarin during root initiation of rooting apple cultivars in vitro. Journal of Advances in Horticulture Science, 7: 33-6.
- Kaushal, N., Modgil, M., Thakur, M. and Sharma, D. R. 2005. In vitro clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. Indian Journal of Experimental Biology, 43: 561-5.
- Leslie, C. and McGranahan, G. 1992. Micropropagation of Persian walnut (*Juglans regia* L.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, 18: 136-150.

- Linington, I. M. 1991. In vitro propagation of *Dipterocarpus intricatus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC), 27: 81-88.
- Liu, M. S. C. 1993. Plant regeneration in cell suspension culture of sugarcane as affected by activated charcoal, medium composition and tissue culture. Taiwan Sugar, May-June, 18-25.
- Lloyd, G. and McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society, 30: 421-427.
- Marin, J. A., Jones, O. P. and Hadlow, W. C. C. 1993. Micropropagation of columnar apple trees. Journal of Horticulture Science, 289: 68-97.
- McGranahan, G., Leslie, C. A. and Driver, J. A. 1988. In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. Horticulture Science, 23 (1): 220.
- McGranahan, G. H., Driver, A. and Tulecke, W. 1987. Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga, G. M, Durzan, D. J. (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry, 3: 261-271.
- Modgil, M., Sharma, D. R. and Bhardwaj, S. V. 1999. Micropropagation of apple cv. Tydeman Early Worcester. Scientia Horticulture, 81: 179-188.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Nguyen, T. V., Thu, T. T., Claeys, M. and Angenon, G. 2007. *Agrobacterium* mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 91: 155-64.
- Pan, M. J. and Van Staden, J. 1998. The use of charcoal in in vitro culture-a review. Plant Growth Regulation, 26: 155-163.
- Pérez-Tornero, O. and Burgos, L. 2007. Apricot micropropagation. In: Jain S. M., Häggman, H., editors. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 267-278.
- Pieper, W. and Zimmer, K. 1976. Clonal propagation of *Phalaenopsis in vitro*. Acta Horticulturae, 64: 21-23.
- Pierik, R. L. M. 1987. In vitro propagation of higher plants. Boston7 Martinus, Nijhoff Publishers. In: Pati, P. K, Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P. S. 2006. In vitro propagation of rose- a review. Journal of Biotechnology Advances, 24 (1): 94-114.
- Pittet, H. and Moncousin, C. 1981. Multiplication nouvelle du rosier. Review of Horticulture Suisse, 54: 169-173.
- Preece, J. E., Van Sambeek, J. W., Huetteman, C. A. and Gaffney, G. R. 1989. In vitro studies with walnut (*Juglans*) species. In: Phelps, J. E. (ed) The Continuing Quest for Quality, Proceed 4th Black Walnut Symp. Carbondale, Illinois. pp 159-180.
- Revilla, M. A., Majada, J. and Rodriguez, R. 1989. Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. Tree Physiology, 46: 149-151.
- Río Leal, D., Sánchez-Olate, M., Avilés, F., Materan, M. E., Uribe, M., Hasbun. R. and Rodriguez, R. 2007. Micropropagation of *Juglans regia* L. In: Jain, S. M., Haggman, H., editors. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, the Netherlands: Springer. 381-390.
- Rout, G. R., Samantaray, S., Mottley, J. and Das, P. 1999. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. Scientia Horticulture, 81: 201-228.
- Sharma, M., Modgil, M. and Sharma, D. R. 2000. Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. Indian Journal of Experimental Biology, 38: 1236-40.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.
- Solar, A., Colaric, 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.). Journal of Plant Science, 170 (3): 453-461.
- Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Journal of Biotechnology Advances, 26: 618-31.
- Toosi, S. and Dilmagani, K. 2010. Proliferation of *Juglans regia* L. by *in vitro* embryo culture. Journal of Cell Biology and Genetics, 1 (1): 12-19.
- 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 Horticultural Science, 69: 833839.
- Webster, C. A. and Jones, O. P. 1989. Micropropagation of apple rootstock M9: Effect of sustained subculture on apparent rejuvenization in vitro. Horticultural Science, 64: 421-428.
- Webster, C. A. and Jones, O. P. 1991. Micropropagation of some cold hardy dwarfing rootstocks for apple. Journal of Horticultural Science, 66: 1-6.
- Werner, E. M. and Boe, A. A. 1980. In vitro propagation of Malling 7 apple rootstock. Horticultural Science, 15: 509-10.
- Yang, H., Zhou, C. W. U. 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.
- Yepes, L. M. and Aldwinckle, H. S. 1994. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. Journal of Plant Growth Regulation, 15: 55-67.
- Ziv, M. and Halevy, A. H. 1983. Control of oxidative browning and in vitro propagation of *Strelitzia reginae*. HortScience, 18: 10851087.

Effect of Explant Sampling Time and Culture Medium Conditions on Explant Establishment of Two Walnut Cultivars; Chandler and Jamal

Ehteshamnia¹, A., Gholami^{2*}, M. and Esna-Ashari³, M.

Abstract

Oxidation of exuded phenolic compounds into the culture media, culture medium browning and ceasing growth are the main obstacles in explants establishment during walnut micropropagation. This research was performed as a factorial experiment based on a completely randomized design with three factors including cultivar (Jamal and Chandler), shoot sampling time (May, July and September) and medium conditions (adding activated charcoal to the medium, placing cultures for 24 and 72 h in darkness, sub-culturing thrice per 24 h, twice per 72 h and once after 144 h and the control). Results of the variance analysis of the data related to the establishment of micro-cuttings in culture medium showed that cultivar, sampling time and culture medium conditions as well as their interactions, except the interaction between micro-cuttings and sampling time had significant effects on the Jamal and Chandler cultivar micro-cuttings establishment. According to the results of the means comparison, regarding treatments including placement of cultures thrice per 24 hours and adding activated charcoal had a highest level of micro-cuttings establishment in culture medium having significant difference with the other treatments. On the other hand, the results showed a highly significant negative correlation (-0.86) between the micro-cuttings browning index and micro-cuttings establishment. In conclusion, the micro-cuttings establishment of Chandler cultivar had the higher rate compared to Jamal cultivar having statistically significant differences. Finally, it can be stated that collection of micro-cuttings in May and sub-culturing them thrice every 24 hours or adding activated charcoal showed the best results in Chandler and Jamal micro-cuttings establishment.

Keywords: Micropropagation, Browning, Phenolic compounds, Active charcoal

1, 2 and 3. PhD Student, Professors, Respectively, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran

✉: Corresponding author

Email: mgholami@basu.ac.ir