

تأثیر کیتوزان بهینه شده با پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) و تیدیا زورون (TDZ) بر ممانعت از تولید فنل و میزان پرآوری در جداکشت‌های گردو

مهديه رضایی تبار^{۱*}، محمدرضا دادپور^۲، سیما پناهی‌راد^۳ و علیرضا مطلبی‌آذر^۴

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۶)

چکیده

گردو به‌عنوان یکی از محصولات مهم اقتصادی و با ارزش غذایی بالا محسوب می‌شود. روش‌های ازدیاد غیرجنسی گردو به علت وجود مواد فنلی که موجب کاهش تقسیم سلولی می‌شود، نتوانسته است به تولید انبوه دانه‌های گردو منجر شود. بافت‌های گردو غنی از ترکیبات فنلی می‌باشند که پس از جداشدن از پایه مادری به‌عنوان ریزنمونه، به رنگ تیره درآمده و ضمن انتشار به محیط کشت، ریزنمونه و استقرار آن را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند. کیتوزان به‌عنوان یک پلیمر زیستی و طبیعی امروزه در کشت بافت گیاهان به‌صورت گسترده استفاده می‌شود. مطالعه حاضر با هدف برطرف کردن مشکل مذکور در گردو در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای انجام شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با شش تکرار به‌ازای هر تیمار اجرا شد. تیمارهای مورد نظر در این پژوهش شامل تیمار شاهد (محیط کشت موراشیگ و اسکوگ)، تیدیا زورون با غلظت ۰/۴ میلی گرم در لیتر، پلی‌وینیل‌پیرولیدین با غلظت ۰/۳ گرم در یک لیتر، کیتوزان با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر، ترکیب TDZ، PVP و کیتوزان (با غلظت‌های استفاده شده در تیمارهای قبلی) و در نهایت نانوکامپوزیت کیتوزان بهینه شده با PVP و TDZ در دو سطح ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر بود. ترکیب نانوکیتوزان در هر دو سطح، زنده‌مانی مریستم را به طور معنی‌داری افزایش داد ($p < 0.05$). میزان باززایی، به‌عنوان شاخص رشد رویشی در تیمار نانو کیتوزان ۱۰٪ از دیگر تیمارها بیشتر بود. همچنین پرآوری شاخساره در تیمار ذکر شده افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر تیمارها داشت.

کلمات کلیدی: ازدیاد، کشت بافت، گردو، نانو کیتوزان

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

* پست الکترونیک: m.rezaieatabar@gmail.com

مقدمه

گردو از میوه‌های آجیلی (مغزدار) از خانواده Juglandaceae و جنس *Juglans* بوده و دارای ۲۱ گونه می‌باشد (حسنی^۱ و همکاران، ۲۰۲۰). گردو گیاهی تک‌پایه با ۳۲ کروموزوم، دیپلوئید و کاملاً دگرگشن است و برگ‌های آن مرکب، متقابل و متناوب بوده و توسط باد گرده‌افشانی می‌شود (رضایی‌ظفرقندی و رحمتی^۲، ۲۰۲۰). گردو سخت ریشه‌زا است و از این‌رو ازدیاد گونه‌ها و کولتیوارهای مختلف آن با روش‌های متداول غیرجنسی تقریباً امکان‌پذیر نمی‌باشد. از آنجایی که در ازدیاد جنسی گردو تفرق صفات دیده می‌شود و نیز قلمه‌زدن در این گیاه با مشکل روبرو است (پراجاوا^۳ و همکاران، ۲۰۲۱). بنابراین برای حفظ خصوصیات ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر و تکثیر رویشی آنها در کشور، پیوند و کشت بافت تنها راه علمی و مفید بشمار می‌رود. کشت بافت تکنیکی است که امکان تولید گیاه در محیط درون‌شیشه‌ای را فراهم می‌کند (یاری^۴ و همکاران، ۲۰۱۴). اساس این تکنیک توتی پوتنسی^۵ است که بیان می‌کند هر سلول گیاهی دارای کلیه اطلاعات ژنتیکی لازم برای تبدیل شدن به یک گیاه کامل را دارا است (عشقی‌سنایی^۶ و همکاران، ۲۰۲۰). با این‌حال در کشت بافت گردو نیز پدیده فنلی شدن و کاهش رشد ریزنمونه‌ها بسیار دیده می‌شود، بنابراین، تلاش می‌شود با به‌کارگیری ترکیبات بازدارنده فنل، مانند پلی‌وینیل‌پیرولیدون این مشکل را تا حدودی حل کرد. ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه با مصارف فیزیولوژیکی و متابولیکی مهم در گیاهان هستند. این ترکیبات نقش مهمی را در رشد، تناوب نسل و همچنین محافظت در مقابل پاتوژن‌ها و شکارگرها بازی می‌کنند (امام و همکاران، ۱۳۹۲). تولید ترشحات فنلی از ریزنمونه‌هایی که به‌تازگی کشت شده‌اند به‌عنوان یک مشکل جدی در استقرار و رشد گردوی ایرانی گزارش شده است که منجر به قهوه‌ای شدن محیط و نمونه‌ها می‌شود. عبدالواحد^۷ و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه استفاده از زغال فعال و آنتی‌اکسیدان‌ها در محدودکردن ترشحات فنلی در کشت

درون شیشه‌ای باقلا با پیش‌تیمار بذر در پلی‌وینیل پیرولیدون^۸ و سپس کشت آن در محیط کشت حاوی زغال فعال و سطوح مختلف از تعدادی آنتی‌اکسیدان (آسکوربیک اسید، سیستئین و نیترات‌نقره) به این نتیجه رسیدند که پیش‌تیمار بذر با پلی‌وینیل‌پیرولیدون به غلظت mg/L ۱۰۰۰ و کشت در محیط همراه با اسید آسکوربیک mg/L ۱ و یا زغال فعال (۱۰ g/L) تا حد زیادی از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌کاهد. کرسا^۹ و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی کارایی تکثیر جوانه رویشی و ریشه‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای سیب رقم توپاز^{۱۰} برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه از آنتی‌اکسیدان و زغال فعال استفاده کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که اسید آسکوربیک با غلظت mg/L ۱۵۰ و زغال فعال با غلظت g/L ۱ توانست به طور کامل مانع قهوه‌ای شدن ریزنمونه به علت اکسیداسیون فنل شود (شیرازی^{۱۱} و همکاران، ۲۰۲۰). در مطالعه انجام شده بر روی گیاه فندق برای به‌دست آوردن سلول‌های سالم از سه محیط کشت MS^{۱۲}, DKW^{۱۳}, NRM^{۱۴} در ترکیب با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدسیتریک، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استیک اسید و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP استفاده شد. نتایج نشان داد که این ترکیبات به طور متوسط مانع از قهوه‌ای شدن سلول‌ها می‌شوند و بیشترین شاخص رشد مربوط به محیط کشت NRM با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP بود (پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار^{۱۵}، ۲۰۱۱).

تیدیاژورون^{۱۶} یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی است که در ریز ازدیادی برای تکمیل محیط‌هایی مانند محیط MS استفاده می‌شود. TDZ باعث اندام‌زایی گیاه (بازسازی شاخه‌ها) و باززایی گیاه می‌شود. تولید مثل را سرعت می‌بخشد و ژنوتیپ‌های جدیدی را برای بازار فراهم می‌کند (چکرابرتی و همکاران، ۲۰۰۹).

مطالعه‌ای برای به‌دست آوردن توت از نهال بذری آن انجام شد. غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) TDZ در ترکیب با ایندول بوتیریک اسید (IBA) استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین درصد

9. Keresa

10. Topaz

11. Shirazi

12. Murashige and Skoog

13. Driver and koniuki

14. Nas and read

15. Payghamzadeh and Kazemi tabar

16. Thidiazuron (TDZ)

1. Hassani

2. Rezaei-Zafarghandi and Rahmati-Joneidabad

3. Prajwala

4. Yari

5. Totipotancy

6. Eshaghi Sanayi

7. Abdelwahed

8. Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP)

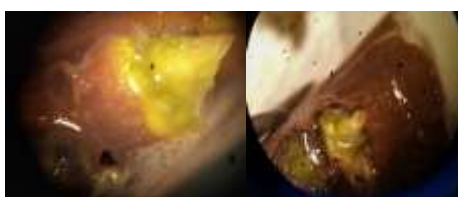
از تولید فتل و پرآوری ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش

این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت و ارگانوژن دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز انجام گرفت. نانوکامپوزیت مورد استفاده در این پژوهش در آزمایشگاه نانوشیمی دانشگاه مراغه سنتز شد.

تهیه مواد گیاهی

نمونه‌های گیاهی پایه پارادوکس^۳ گردو و رقم تجاری چندلر^۴ از مرکز تحقیقات و کلکسیون گردو کمال‌آباد کرج تهیه گردید. نمونه‌های گیاهی شامل شاخه‌های یک‌ساله با جوانه‌های زمستان‌گذران هستند. از جوانه‌های زمستان‌گذران در خردادماه جهت تهیه ریزنمونه استفاده گردید. پس از گندزدایی جوانه‌ها با اتانول ۷۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه، مریستم شاخه در درون آب دیونیزه از جوانه‌ها جدا شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت داخل آب مقطر استریل، ۰/۴ g/L اسید آسکوربیک و ۰/۳ g/L PVP قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت با آب مقطر استریل شستشو داده شد و در نهایت در زیر هود لامینار و با به‌کارگیری استرومیروسکوپ، فلس‌زدایی و در محیط کشت استقرار یافت (شکل ۱).



شکل ۱- فلس‌زدایی جوانه‌ها

شیشه‌ای ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد و محیط‌های کشت در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد (فشار ۱/۲ اتمسفر) ضدعفونی شدند. پس از ضدعفونی و جامد شدن محیط کشت، نمونه‌های تهیه شده بر روی محیط کشت استقرار پیدا کردند و سپس به اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای روز

فراوانی باززایی (۹۶/۶۷ درصد) و بیشترین تعداد شاخه (۴/۴۳) در محیط MS با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد (کرسا و همکاران، ۲۰۱۲). پلی‌ساکارید کیتوزان یک کوپلیمر از ۲-گلوکز آمین و N-استیل D-گلوکز آمین است که به‌وسیله واکنش داستیل^۱ شدن از کیتین مشتق می‌شود. کیتین از فراوان‌ترین بیوپلیمرها بعد از سلولز می‌باشد. مولکول‌های کیتوزان پاسخ‌های دفاعی در گیاه به راه می‌اندازد که منجر به شکل‌گیری سدهای فیزیکی و شیمیایی بر ضد بیمارگرها و مواد فنی می‌شود (گوتا^۲ و همکاران، ۲۰۱۲). محلول پاشی کیتوزان هدایت روزه‌ای را افزایش می‌دهد و باعث کاهش تعرق، بدون تأثیر در ارتفاع بوته، طول ریشه، سطح برگ و یا زیست‌توده گیاهی می‌شود (گوتا و همکاران، ۲۰۱۲). تریازول‌ها و تیدیاژورن از ترکیبات بسیار مؤثر در پرآوری جداکشت‌های درون‌شیشه‌ای هستند که در گیاهان مختلف نتایج امیدوارکننده‌ای داشته‌اند (حسینی و همکاران، ۲۰۲۰). در گردو پژوهش‌های اندکی در راستای اثربخشی تیدیاژورن بر روی پرآوری انجام گردیده است. با این حال احتمال می‌رود با ویژگی‌هایی که این مواد داشته و از تخریب و انهدام سایتوکینین‌های درون‌زاد جلوگیری می‌کنند، پرآوری گردو با تیمار این دسته از مواد بهبود پیدا کند (کرسا و همکاران، ۲۰۱۲).

در این پژوهش در راستای بهبود ازدیاد درون‌شیشه‌ای گردو تأثیر کیتوزان بهینه شده با PVP و TDZ جهت جلوگیری

تهیه محیط کشت

از محیط کشت پایه حاوی ۳ درصد ساکارز استفاده گردید. pH محلول با استفاده از NaOH یا HCl یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم گردید. برای تهیه محیط کشت نیمه‌جامد ۲ گرم فیتاژل و سپس تیمارها که در جدول ۱ آمده است، اضافه شد. پس از حل شدن کامل فیتاژل، در داخل هر ظرف

3. Paradox
4. Chandler

1. Deacetylated
2. Gotea

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت MS

میزان مورد استفاده	تیمار	
بدون تیمار	شاهد	T ₁
0.3 gr/L	PVP	T ₂
0.1mg/L	Cs ²⁵	T ₃
0.4 mg/L	TDZ	T ₄
0.3gr/L+0.4 mg/L	PVP+TDZ	T ₅
0.1mg/L+0.4 mg/L	Cs+TDZ	T ₆
0.1mg/L+0.3 gr/L	Cs+PVP	T ₇
0.05 mg/L	Cs+PVP+TDZ	T ₈
0.1 mg/L	Cs+PVP+TDZ	T ₉

شمار شاخساره و شاخص پرآوری (شمار شاخه نوپدید به ازای واحد زمان)

تعداد شاخساره به ازای هر واحد آزمایشی که نشان دهنده پرآوری می باشد از طریق شمارش شاخه های جانبی نوپدید به دست آمد.

میزان نکروزه شدن و فنلی شدن جداگشت ها
در پایان آزمایش (یک ماه پس از شروع کشت)، سطح نقاط قهوه ای شده (شاخص نکروز) نسبت به سطح نقاط سبز (سالم و کلروفیل دار) محاسبه شد. از این طریق میزان گسترش فنلی شدن که به نکروز می انجامد، به دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده ها

در ابتدا آزمون نرمال بودن داده ها و یکنواختی واریانس های درون تیماری انجام شده و مورد تأیید قرار گرفت. تجزیه واریانس داده ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها توسط آزمون اس ان کا در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ و برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل (Excel) ورژن ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج و بحث

میزان زنده مانعی جداگشت مریستم گردو در بازه زمانی پنج روزه

۲۴ درجه سانتی گراد و شب ۱۸ درجه سانتی گراد و نور مصنوعی لامپ LED منتقل شد. این پژوهش طی ۳ ماه انجام شد و بعد از گذشت ۱ ماه داده برداری صورت گرفت.

طرح آزمایشی و فاکتورهای مورد بررسی

در این پژوهش به منظور بررسی تأثیر کیتوزان بهینه شده با PVP و TDZ بر پرآوری و جلوگیری از تولید فنل در کشت درون شیشه ای گردو آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار به ازای هر تیمار اعمال شد.

کامپوزیت

در این آزمایش، از نانوذرات بیوپلیمر Cs برای بارگذاری PVP استفاده شد. از TDZ برای اتصال متقابل نانوحامل Cs استفاده شد. علاوه بر این TDZ منجر به اتصال متقابل نانوذرات Cs به صورت انعقادی می شود که با هم زدن نانوحامل ها در طول شب ادامه یافت و با آب مقطر شسته شد تا مواد غیرفعال شده در مایع رویی از بین برود. سپس نانوحامل های تهیه شده به روش فریز درایر، توسط پمپ خلأ خشک شدند.

صفات مورد اندازه گیری

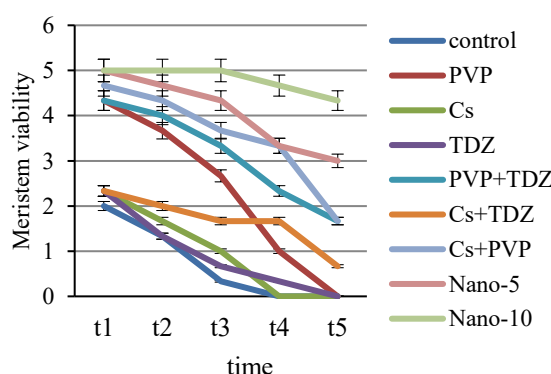
شمار برگ و شاخص پلاستوکرون^۱

در این آزمایش، برگ های پدید آمده به ازای هر شاخساره در توالی های زمانی هفت روزه به مدت ۲ ماه شمارش گردید. شاخص پلاستوکرون یا زمان لازم برای پیدایش هر برگ که میزان باززایی و اندام زایی را نشان می دهد، از داده های مربوط به باززایی محاسبه شد.

1. Plastochron

۴۰٪ از جداکشت‌ها از بین رفتند. تیمار PVP، هر چند روز نخست بازدارنده از مرگ جداکشت بود، ولی تأثیر آن بر سرعت کاهش یافت و در روز پنجم هیچ کدام از مریستم‌ها زنده نماندند. Cs و TDZ به همراه PVP اثرات بهتری بر روی زنده‌مانی مریستم در روز نخست داشتند و تا روز پنجم توانستند نزدیک به ۳۰٪ از مریستم‌ها را زنده نگه دارند که اختلاف معنی‌داری ($P < 0.5$) با تیمار PVP به‌تنهایی داشتند. تیمارهای دیگر، شامل Cs و TDZ و ترکیب آنها، اثر چندانی بر روی زنده‌مانی مریستم چه در روز نخست و چه در روز پنجم نداشتند. با توجه به اینکه عامل اصلی مرگ مریستم در کشت درون‌شیشه‌ای گردو، فنی شدن جداکشت می‌باشد، PVP به‌عنوان مهم‌ترین بازدارنده از سنتز فنل می‌تواند زنده‌مانی این اندام را افزایش دهد. با این حال، کارایی PVP در بهبود زنده‌مانی مریستم به روزهای آغازین کشت محدود می‌شود. کیتوزان در ترکیب با این ماده، کارایی سنتز فنل را کاهش می‌دهد (نمودار ۱).

بررسی میزان زنده‌مانی مریستم در بازه زمانی پنج روزه و به فواصل زمانی یک‌روزه نشان داد که ترکیب نانوکیتوزان در هر دو غلظت بهترین تأثیر را در جلوگیری از مرگ جداکشت‌ها در روز نخست داشت. به‌طوری‌که هیچ‌کدام از پنج مریستم کشت شده در این تیمار، طی روز نخست از بین نرفتند. تیمار PVP به‌تنهایی و یا در ترکیب با TDZ و Cs، به‌خوبی از مرگ مریستم در روز نخست جلوگیری نمود. با این‌حال، Cs و TDZ به‌تنهایی اثر معنی‌داری ($P < 0.5$) در بهبود زنده‌مانی مریستم، طی روز نخست نداشتند. سیر نزولی زنده‌مانی مریستم در همه تیمارها دیده شد. ولی کاهش میزان زنده‌مانی مریستم در تیمار نانو کیتوزان ۱۰٪ پس از روز سوم و با شیب کند رخ داد. بیشتر مریستم‌های کشت شده (بیش از ۸۵٪) در این تیمار زنده ماندند. در تیمار نانوکیتوزان ۵٪، هر چند میزان مرگ مریستم در مقایسه با تیمارهای دیگر کم بود، ولی این رویداد از روز دوم تا روز پنجم ادامه داشت و سرانجام حدود



نمودار ۱- میزان زنده‌مانی جدا کشت مریستم گردو در بازه زمانی پنج‌روزه

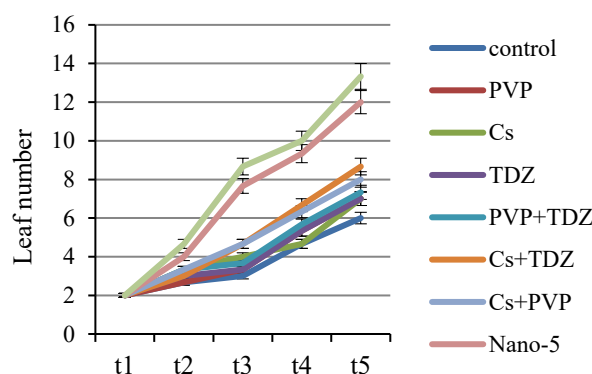
برگ در چهار هفته برسد. برگ‌زایی بالا و پلاستوکرون کوتاه که نشان‌دهنده رشد فزاینده رویشی می‌باشد، در تیمار نانو کیتوزان بهبود چشمگیری یافت. نانوکیتوزان، نه‌تنها از مرگ مریستم جلوگیری می‌کند، بلکه با رهاپیش آهسته و پیوسته مواد همراه، مانع فنی شدن بافت که بازدارنده تقسیمات سلولی است، می‌شوند؛ بنابراین مریستم می‌تواند در بازه زمانی پایین به برگ‌زایی بالا برسد و روند فعالیت رویشی خود را افزایش دهد (نمودار ۲).

میزان پرآوری شاخساره گردو

میانگین شمار شاخساره که نشان‌دهنده میزان پرآوری جداکشت می‌باشد، در ابتدای کشت مریستم فراتر از یک

میزان باززایی جدا کشت‌های مریستم گردو

باززایی جداکشت‌های مریستم گردو که نشانگر میزان فعالیت رویشی این اندام می‌باشد، در تیمار شاهد با شیب ملایم تا هفته دوم افزایش یافته و پس از آن شتاب گرفت و به پلاستوکرون شش برگ در چهار هفته رسید. در تیمارهای TDZ، Cs و PVP به همراه TDZ نیز روندی همسان دیده شد. ولی کیتوزان به همراه TDZ و PVP بهبود میزان باززایی را به همراه داشت. دو تیمار نانوکیتوزان ۵ و ۱۰ درصد افزایش معنی‌داری بر روی میزان و روند باززایی مریستم گردو داشت. مریستم تیمار شده با نانوکیتوزان در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، توانست به پلاستوکرون سیزده

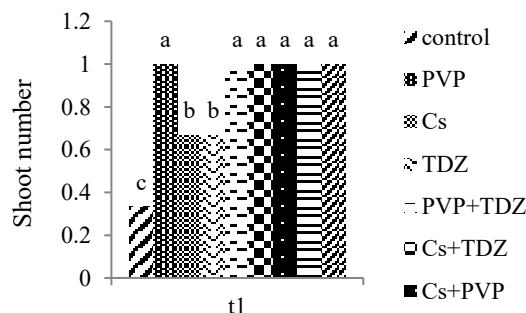


نمودار ۲- میزان برگ‌زایی جدا کشت‌های مریستم گردو

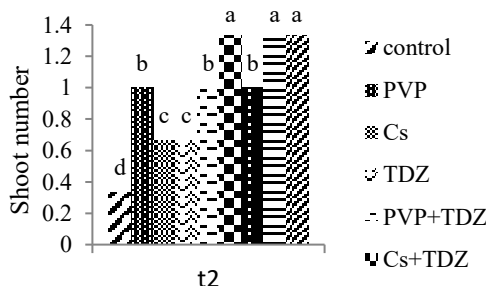
باگذشت هفت روز از کشت مریستم گردو، نخستین نشانه‌های شاخه‌زایی یا جست شاخه‌های کناری، در تیمارهای نانوکیتوزان و نیز تیمارهای دارای TDZ دیده شد. تیدیا زورون که بهبود پرآوری شاخساره را به دنبال دارد، در این آزمایش بیشترین کارایی خود را در ترکیب با کیتوزان نشان داد و اثر یکسانی با دو تیمار نانوکیتوزان داشت (نمودار ۴).

دو هفته پس از کشت مریستم گردو، افزایش معنی‌داری در

نرفت. پایین بودن شمار شاخساره در برخی از تیمارها، به از بین رفتن مریستم مربوط می‌شد که بیشترین میزان آن در تیمار شاهد بود. در تیمارهای دارای PVP و نانوکیتوزان که مرگ مریستم پایین بود، میانگین یک شاخساره به‌ازای هر جداکشت مریستم به دست آمد، بنابراین، نانوکیتوزان و PVP، با بازدارندگی از مرگ مریستم در روز نخست، جلوی کاهش شمار شاخساره را گرفته و تأثیری در افزایش آن نداشتند (نمودار ۳).



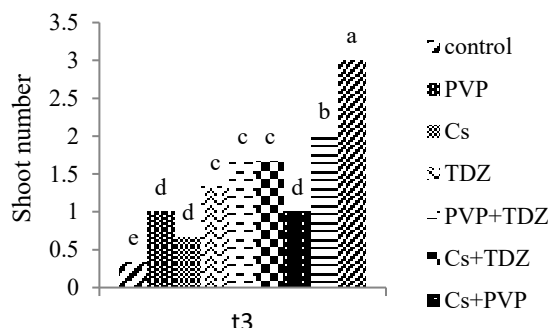
نمودار ۳- میزان پرآوری شاخساره گردو در آغاز کشت مریستم. ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون SNK ندارند.



نمودار ۴- میزان پرآوری شاخساره گردو در هفته نخست کشت مریستم. ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون SNK ندارند.

غلظت بالا، بیشترین شمار شاخه‌زایی را در پی داشت (نمودار ۵).
سه هفته پس از کشت مریستم گردو، شمار شاخساره در

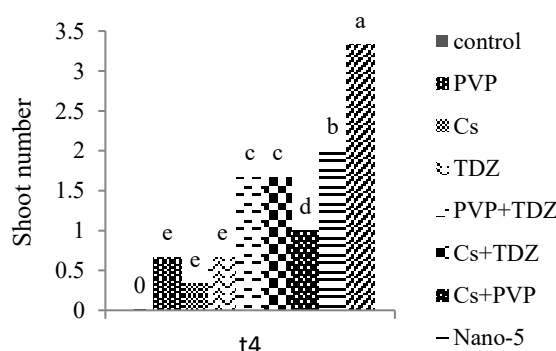
شمار شاخساره‌های پدید آمده به دنبال تیمار با نانوکیتوزان دیده شد. تیمارهای دیگر بدون تغییر بودند، در حالی که تیمار شاهد کمترین میزان شاخساره و تیمار نانوکیتوزان با



نمودار ۵- میزان پرآوری شاخساره گردو در هفته دوم کشت مریستم. ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون SNK ندارند.

همراه TDZ و تیدیاورون با PVP، افزایش یا کاهش در پرآوری شاخساره دیده نشد. در دو تیمار نانوکیتوزان، افزایش چشمگیری در روند شاخه‌زایی بروز نمود که بیشترین میزان آن در نانوکیتوزان ۱۰ درصد بود (نمودار ۶).

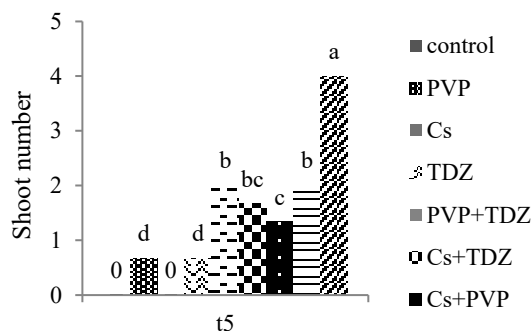
تیمار شاهد به صفر رسید که گواهی بر مرگ همه مریستم‌ها در این تیمار بود. در تیمارهای کیتوزان، TDZ و PVP نیز کاهش در شمار شاخساره، به کاهش میزان پرآوری شاخه انجامید. در سه تیمار ترکیبی کیتوزان با PVP، کیتوزان به



نمودار ۶- میزان پرآوری شاخساره گردو در هفته سوم کشت مریستم. ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون SNK ندارند.

در این آزمایش مشخص شد PVP با کاهش میزان مرگ و میر مریستم می‌تواند به طور غیرمستقیم شمار شاخساره و پرآوری را کنترل کند. از سوی دیگر، TDZ نیز به طور مستقیم پرآوری را کنترل می‌کند. نانوکیتوزان دارای PVP و TDZ با داشتن هم‌زمان دو عامل کنترل پرآوری و رهایش تدریجی آن، پیدایش شاخه‌های کناری را به طور معنی‌داری افزایش داده و از این دیدگاه می‌توان این ترکیب نوین را برای بهبود پرآوری درون شیشه‌ای گردو بکار برد. تحقیقات متعدد نشان داده است که قبل از تهیه ریزنمونه

چهار هفته پس از کشت مریستم گردو، شمار شاخساره در تیمار شاهد و کیتوزان به صفر رسید که گواهی بر مرگ همه مریستم‌ها در این تیمار بود. در تیمارهای TDZ، PVP و نیز نانوکیتوزان ۵ درصد شمار شاخساره، ثابت ماند و تغییری نکرد. در سه تیمار ترکیبی کیتوزان با PVP، کیتوزان به همراه TDZ و تیدیاورون با PVP، افزایش در پرآوری شاخساره دیده شد. در تیمار نانوکیتوزان ۱۰ درصد، افزایش چشمگیری در روند شاخه‌زایی بروز نمود و به سه شاخساره به‌ازای هر مریستم رسید (نمودار ۷).



نمودار ۷- میزان پرآوری شاخساره گردو در هفته چهارم کشت مریستم. ستون‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون SNK ندارند.



شکل ۲- میزان پرآوری شاخساره گردو در هفته چهارم کشت مریستم

حداقل ممکن را دارا باشد، قابل توصیه است. در بررسی اثر نانوکیتوزان بهینه شده با PVP و TDZ در شاخص‌های میزان آلودگی، زنده ماندن و شاخص کیفیت ظاهری رشد، تفاوت معنی‌دار مشاهده شد که از نظر زنده ماندن نمونه‌ها، محیط کشت دارای نانوکیتوزان همراه با PVP و TDZ مناسب‌تر و از نظر شاخص کیفیت ظاهری رشد، محیط کشت دارای نانوکیتوزان در سطح احتمال خطای ۵ درصد محیط مناسب‌تری بود. نداکیدی^۳ و همکاران (۲۰۱۴) نیز اثر آسکوربیک اسید را در کاهش قهوه‌ای شدن و افزایش زنده ماندن ریزنمونه‌ها مثبت گزارش کردند. یاری و همکاران (۲۰۱۴) اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف سیستمین، اسیدسیتریک، اسید آسکوربیک، آسپارژین، PVP، فلورو گلوکسینال را در موفقیت استقرار بررسی کردند و همه تیمارها نسبت به شاهد وضعیت بهتری داشتند. اثر PVP نسبت به آسکوربیک اسید اثر ماندگارتری در کنترل قهوه‌ای شدن دارد. اضافه کردن PVP به محیط کشت گیاه نه تنها باعث کاهش قهوه‌ای شدن گردید بلکه به طور قابل توجهی نرخ تکثیر را افزایش داد. اثرات مثبت نانو می‌تواند به دلیل جذب رنگدانه‌های سیاه و قهوه‌ای (ترکیبات شبه‌فنلی و کوئینون) و یا ترکیبات سمی که در اثر اتوکلاو محیط کشت به وجود آمده‌اند و یا ترکیبات بازدارنده رشد که از خود

از گیاه مادری و کشت آن در محیط کشت، برخی فاکتورهایی که گیاه مادری را تحت تأثیر قرار می‌دهند، مانند شدت نور، دما و... بر محتوای فنل درونی و فعالیت آنزیم‌ها و قهوه‌ای شدن ریزنمونه تهیه شده طی فصل رشد تأثیرگذار هستند و به نظر می‌رسد شرط اولیه جهت انجام یک کشت موفق در گیاهان با محتوای فنل بالا مانند گردو، تهیه ریزنمونه در زمان مناسب و کشت آن در شرایط کنترل شده و مواد بازدارنده تولید فنل باشد (حسامی^۱ و همکاران، ۲۰۱۹b).

زنده‌مانی

زمانی که بافت‌های گیاهی در موقعیت‌های تنشی مانند آسیب مکانیکی قرار می‌گیرند (نظیر مورد جداسازی یک ریزنمونه از گیاه پایه)، ساخت ترکیبات فنلی تحریک می‌گردد. فنل‌ها تولیداتی به شدت ناپایدار هستند و به آسانی اکسیده می‌شوند، این مواد اکسید شده می‌توانند برای گیاه سمی باشند. اکسیداسیون پلی‌فنل‌های ترش‌چای از قسمت برش خورده باعث قهوه‌ای شدن بافت می‌شود (براوو^۲، ۱۹۹۸). بعضی از عناصر معدنی، مثل Mn^{+2} (یک کوفاکتور پراکسیداز) و Cu^{+2} (قسمتی از آنزیم فنلاز) می‌توانند اکسیداسیون ترکیبات فنلی را تحریک نمایند، بنابراین کاربرد فرمول‌های نمکی که فاقد این عناصر بوده یا مقدار

3. Ndakidemi

1. Hesami
2. Bravo

بافت‌ها ترشح شده‌اند، باشد (حسامی و همکاران، ۲۰۱۹a).

پراوری

تولید ریزشاخه‌های مناسب برای ریشه‌زایی و تکثیر انبوه در مرحله پراوری صورت می‌گیرد (هیدانگ‌مایوم^۱ و همکاران، ۲۰۱۹). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از اثر غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان بهینه شده با PVP و TDZ مشاهده شد که غلظت ۱۰ mg/L در شاخص‌های تعداد شاخساره، تعداد برگ و کیفیت، مناسب‌تر از غلظت‌های دیگر بود و بهترین محیط از نظر تولید جوانه جانبی محیط دارای ۱۰ mg/L از این نانو ترکیب بود. گزارش‌های مختلف نشان‌دهنده مناسب‌تر بودن غلظت‌های پایین‌تر TDZ برای مرحله استقرار و غلظت‌های بالاتر برای مرحله پراوری است. استفاده از TDZ در غلظت ۶/۸ میکرومولار به همراه ۱ میکرومولار IBA موجب شد در ۶۱ درصد ریز نمونه‌ها شاخه‌زایی نابجا رخ دهد (هیتی‌بندرالاجه^۲ و همکاران، ۲۰۱۸). در گزارش دیگر استفاده از TDZ با غلظت ۴/۵ میکرومولار نسبت به ۱۳/۶ میکرومولار تعداد شاخه نرمال بیشتری تولید کرد (چاکرابورتی^۳ و همکاران، ۲۰۰۹). در تکثیر رویشی از طریق ریزازدیادی پایه‌های تلخ و شیرین بادام با استفاده از کشت جوانه و جنین در فصل بهار، محیط کشت DKW4 به همراه هورمون‌های TDZ، BA5 و IBA6 در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را برای

ریزازدیادی تعیین کردند که به افزایش رشد منجر شد (امام و همکاران، ۱۳۹۲).

نتیجه‌گیری کلی

از یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که ترکیب نانو کیتوزان در هر دو غلظت، بهترین تأثیر را در جلوگیری از مرگ جداکشت‌ها در روز نخست داشت. کاهش میزان زنده‌مانی مریستم در تیمار نانو کیتوزان ۱۰٪، پس از روز سوم و با شیب کند رخ داد. بیشتر مریستم‌های کشت شده در این تیمار زنده ماندند (بیش از ۸۵٪). تیمار نانو کیتوزان افزایش معنی‌داری بر روی میزان و روند باززایی مریستم گردو داشت. نانو کیتوزان، نه تنها از مرگ مریستم جلوگیری می‌کند، بلکه با رهایش آهسته و پیوسته مواد همراه، مانع فنلی شدن بافت که بازدارنده تقسیمات سلولی است، می‌شوند. نانو کیتوزان و PVP، با بازدارندگی از مرگ مریستم در روز نخست، جلوی کاهش شمار شاخساره را گرفته و تأثیری در افزایش آن نداشتند. نانو کیتوزان دارای PVP و TDZ، پیدایش شاخه‌های کناری را به طور معنی‌داری افزایش داده و از این رو احتمالاً می‌توان این ترکیب نوین را برای بهبود پراوری درون‌شیشه‌ای گردو بکار برد.

منابع

- امام، م.، قمری‌زارع، ع.، اسدی‌کرم، ف. و لوکی‌انارکی، ک. ۱۳۹۲. ریزازدیادی بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*) از طریق کشت جوانه و جنین. دو فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۱(۱): ۷۷-۸۶.
- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M. and Udupa, S.M. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. *African journal of biotechnology*, 7(8), 997-1002.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11): 317-333.
- Chakraborty, M., Karun, A. and Mitra, A. 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 166(1): 63-71.
- Eshaghi Sanayi, T., Zare Mehrjerdi, M. and Sharifi, A. 2020. Effect of medium, iron-chelating agent and plant growth regulator on micropropagation of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Plant Productions*, 43(2): 309-322.
- Gotea, R., Gotea, I., Sestras, R.E. and Vahdati, K. 2012. In vitro Propagation of Several Walnut Cultivars. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 69(1).

4. Driver and Kuniyuki Walnut
5. Benzyladenine
6. Indole-3-Butyric Acid

1. Hidangmayum
2. Hiti Bandaralage
3. Chakraborty

- Hassani, D., Sarikhani, S., Dastjerdi, R., Mahmoudi, R., Soleimani, A. and Vahdati, K. 2020. Situation and recent trends on cultivation and breeding of Persian walnut in Iran. *Scientia Horticulturae*, 270: 109369.
- Hesami, M., Daneshvar, M.H. and Yoosefzadeh-Najafabadi, M. 2019a. An efficient in vitro shoot regeneration through direct organogenesis from seedling-derived petiole and leaf segments and acclimatization of *Ficus religiosa*. *Journal of Forestry Research*, 30(3): 807-815.
- Hesami, M., Naderi, R. and Tohidfar, M. 2019b. Modeling and optimizing in vitro sterilization of chrysanthemum via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in Plant Science*, 10: 282.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D. and Hemantaranjan, A. 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2): 313-326.
- Hiti Bandaralage, J.C.A., Hayward, A. and Mitter, N. 2018. Structural relation for acclimatization success for in vitro cultured avocado. In *XXX International Horticultural Congress IHC2018: II International Symposium on Micropropagation and In Vitro Techniques*, 1285: 269-280.
- Keresa, S., Bosnjak, A.M., Baric, M., Jercic, I.H., Sarcevic, H. and Bisko, A. 2012. Efficient axillary shoot proliferation and in vitro rooting of apple cv.'Topaz'. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1): 113-118.
- Ndakidemi, C.F., Mneney, E. and Ndakidemi, P.A. 2014. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in in vitro culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. *American Journal of Plant Sciences*, 5(1): 187.
- Payghamzadeh, K. and Kazemitabar, S.K. 2011. In vitro propagation of walnut-A review. *African Journal of Biotechnology*, 10(3): 290-311.
- Prajwala, K. A., Subbaramamma, P., & Viswanath, M. 2021. *In vitro* propagation techniques in pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *The Pharma Innovation Journal*, 10(6):1217-1223.
- Rezaei-Zafarghandi, M.S. and Rahmati-Joneidabad, M. 2020. Effects of thidiazuron on in vitro shoot regeneration of *Morus alba*. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 101(1): 55-61.
- Shirazi, M.R., Rahpeyma, S.A. and Zolala, J. 2020. A new approach to prevent hazelnut callus browning by modification of sub-culture. *Biologia Plantarum*, 64(1): 417-421.
- Yari, M.B., Gholami, M., Esna-Ashari, M. and Kheradmand, H. 2014. Effect of season and explant type on in vitro propagation of *Juglans regia* L. genotypes Z60 and Z63. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7(9): 624.