Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 53, No 4, Winter 2023 (849-858)
DOI: 10.22059/ijhs.2021.314166.1873

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۳، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۴۰۱ (ص ۸۵۸-۸۴۹)

نشریه پژوهشی:

اثر تیمارهای مختلف بر میزان قهوه‌ای‌شدن و ریز ازدیادی تعدادی از ارقام گیلاس (*Prunus avium* L.)

آرزو جلالی[1]، ابراهیم گنجی مقدم[2*] و علی مرجانی[3]
۱ و ۳. دانشجوی دکتری و استادیار، دانشکده کشاورزی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاداسلامی، بجنورد، ایران
۲. دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۱۸)

چکیده

از آنجایی که گیلاس یکی از مهمترین محصولات باغی مناطق معتدله در کشور محسوب می‌شود، استفاده از ریز ازدیادی جهت تسریع در تکثیر آن ضروری است. این مطالعه به منظور بررسی تیمارهای کاهش قهوه‌ای شدن و تاثیر نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بر ریز ازدیادی در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام شد. فاکتور اول، رقم در دو سطح (عدلی و تکدانه)، فاکتور دوم تیمار کاهش قهوه‌ای شدن در چهار سطح (تاریکی، سرما، تاریکی و سرما و آنتی اکسیدان (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک)) و فاکتور سوم تنظیم کننده‌های رشد شاخه‌زایی شامل BAP (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (صفر و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار NAA (صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر) جهت ریشه‌زایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت. بیشترین و کمترین میزان قهوه‌ای شدن به ترتیب در تیمار سرما و تیمار آنتی اکسیدان بود. بیشترین تعداد شاخساره در رقم تکدانه و عدلی به ترتیب با میانگین ۵/٦ و ۵ ریز شاخه بود. بالاترین درصد ریشه‌زایی در رقم تکدانه ۷۸/۷۳ درصد و در رقم عدلی ٦۹/٤ درصد مشاهده گردید. به‌طور کلی، محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در مرحله پرآوری و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA در مرحله ریشه‌زایی برای تکثیر درون شیشه ای رقم عدلی و تکدانه توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ازدیاد رویشی، اسید آسکوربیک، تاریکی، سرما.

The Effect of various treatments on browning and micropropagation of some sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.)

Arezoo Jalali[1], Ebrahim Ganji Moghaddam[2*] and Ali Marjani[3]
1, 3. Ph.D. Student and Assistant Professor, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran
2. Associate Professor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
(Received: Dec. 23, 2021- Accepted: June 08, 2021)

ABSTRACT

In Iran, Sweet cherry is one of the most important horticultural products in temperate regions. So it is necessary to use micropropagation methods to accelerate its reproduction. This study was conducted as factorial experiment based on completely randomized design with two cultivars (Adli and Takdaned), and browning reduction treatments in four levels (dark, cold, dark and cold, antioxidant (100 mg/l ascorbic acid and 150 mg/l citric acid)) and proliferation growth regulators BAP at concentrations of (0, 1 and 2 mg/l) and IBA (0 and 0.01mg/l) and rooting stage treatments consisted of NAA (0 and 1 mg/l) and IBA (0 and 2 mg/l).The results showed that there was significant difference between treatments. The highest and lowest levels of browning were in cold treatment and antioxidan treatment, respectively. The highest number of shoots for Takdaneh (5.6) and for Adli (5) cultivars were 5.6 and 5, respectively. The highest rooting percentage was obtained for Takdaneh (78.73%) and Adli (69. 4%). In general, for Adli and Takdaneh cultivars *in vitro* propagation, MS culture medium containing 2 mg/L BAP and 0.01 mg/L IBA in the proliferation stage and 2 mg/L IBA in the rooting stage is recommended.

Keywords: Ascorbic acid, cold, dark, vegetative propagation.

* Corresponding author E-mail: eganji@hotmail.com

مقدمه

اهمیت گیلاس (*Prunus avium* L.) نه تنها به عنوان اولین محصول تولیدی در اواخر فصل بهار، بلکه به دلیل ارزش غذایی بالا و منبعی از عناصر معدنی مورد توجه است (Ganji Moghaddm *et al.,* 2020).

استفاده از تکنیک کشت بافت در تکثیر و تولید گیاهان سال‌هاست که مورد توجه محققان قرار گرفته که شاید بدین معناست که شیوه‌های سنتی در تکثیر گیاهان مخصوصا گیاهان کلونی فرآیندی زمان‌بر است. تکنیک ریز ازدیادی راهکار مناسبی برای تکثیر و توزیع سریع لاین‌های ارقام جدید و برتر در سطح تجاری است. علاوه بر این، با استفاده از این تکنیک امکان تکثیر انبوه نهال‌های عاری از بیماری و توزیع آن بین کشاورزان وجود دارد (Nuri, 2003).

استفاده از دانهال‌های بذری به‌دلیل تفرق ویژگی‌های پایه و دیر باردهی، استفاده از قلمه به دلیل مشکلات ریشه‌زایی، برای گیلاس به کلی منسوخ شده است از این رو تکثیر آن بیشتر از طریق پیوند انجام می‌شود؛ اما روش‌های تکثیر پیوند نیز بیشتر باعث توسعه، عوامل آلودگی به‌ویژه آلودگی‌های ویروسی شده که موجب کاهش عملکرد، کاهش سیخک‌های بارده، ریزش برگ و میوه در محصول می‌گردد. از این رو با وجود مشکلات تکثیر روش‌های سنتی، تکثیر از طریق ریزازدیادی منجر به تولید گیاهان کلونی سالم و یکنواخت می‌شود (Ganji Moghadm & Bouzari, 2009).

بسیاری از گیاهان چوبی و تعدادی از گیاهان علفی، وقتی در شرایط درون شیشه‌ای کشت می‌شوند، تولید فنل موجب قهوه‌ای شدن ریز نمونه می‌گردند (Corduk*et al.,* 2011). قهوه‌ای شدن ریز نمونه و مرگ احتمالی بافت گیاهی در طی مرحله اول کشت بافت یک مشکل همیشگی است که یکی از مهمترین موانع در ازدیاد ارقام گیلاس به روش درون شیشه‌ای می باشد. خنثی سازی و حذف فنل‌های آزاد شده در محیط کشت، اولین اقدام ضروری در ازدیاد گیلاس محسوب می‌شود. ریزنمونه بعضی از گونه‌های گیاهی اغلب بعد از ۵-۳ روز قرارگیری در محیط کشت، قهوه‌ای رنگ می‌شوند و اغلب رشد آن متوقف و بافت گیاهی از بین می‌رود. قهوه‌ای شدن از طریق فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز بوسیله تحریک واکنش دفاعی ناشی از زخم شدن سلول‌های ریز نمونه رخ می دهد (Pan *et al*., 1999).

پلی‌فنل‌اکسیداز واکنش بین ترکیبات فنلی مختلف و کوئینون‌ها که پروتئین‌های بسیار واکنش‌پذیر و غیراختصاصی هستند را کاتالیز می‌کند و تولید رنگدانه تیره ملانین می‌کند. در سلول‌های سالم، آنزیم‌ها و سوبستراهای آنها بهم متصل نمی‌شوند زیراپلی‌فنل‌ها، سوبستراهای پلی‌فنل اکسیداز در واکوئل‌ها هستند، در حالی که این آنزیم در پلاستیدها یا کلروپلاست‌ها موجود هستند (Leng *et al*., 2009).

تنش‌های مکانیکی و فیزیکی از جمله برش یا زخمی شدن بافت گیاهی باعث تولید پیام برش و مهاجرت آن به بافت‌های مجاور آسیب ندیده شده می‌شود که منجر به سنتز آنزیم‌های مسئول افزایش ترکیبات فنلی شده و فرایند قهوه‌ای شدن را در مسیر متابولیکی تحریک می‌کند (Akbari *et al.,* 2014). در طی زخمی شدن ریزنمونه، واکنش قهوه‌ای شدن شروع می‌گردد. وجود یک همبستگی مثبت بین فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه در گونه‌های مختلف درختان گزارش شده است (Sharma *et al.,* 2002).

در پژوهشی اثر عوامل مختلف بر میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌های خرما مورد بررسی قرار گرفت و گزارش کردند که غلظت ۴ میلی‌مولار پوترسین در کاهش میزان قهوه‌ای شدن اثر بیشتری داشت (Amiri *et al*., 2018).

در پژوهشی گزارش شد که فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز درpH برابر با۱۰ ثبات می‌یابد و به شدت باعث قهوه‌ای شدن می‌گردد که با استفاده از اسید آسکوربیک از بروز این مسئله به میزان زیادی ممانعت به عمل آمد. همچنین اسید آسکوربیک به عنوان ماده‌ای آنتی اکسیدان و ضد قهوه‌ای شدن در کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی استفاده شده است (Hung *et al.,* 2002). Vahidi *et al.* (2017) گزارش کردند استفاده از ۱۰۰میلی‌گرم اسید آسکوربیک و اسید سیتریک در محیط کشت فندق نسبت به شاهد از میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه به میزان ۲۱ درصد جلوگیری کرد.

Hesami *et al.* (2016) در پژوهشی به بررسی اثر اسید آسکوربیک، فلوروگلوسینول و زغال فعال در کنترل قهوه‌ای شدن برگ گیاه انجیر معابد پرداختند و بهترین نتیجه در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک در محیط کشت به دست آمد. طی بررسی اثر زرد چوبه، زغال فعال و اسید آسکوربیک بر میزان قهوه‌ای شدن کالوس نشان داده شد که افزایش رشد کالوس در تیمار اسید آسکوربیک به غلظت ۱ درصد و زردچوبه ۰/۱ درصد به طور معنی‌داری بیشترین مقدار بود (Vahdatpor *et al.*, 2009). در پژوهشی اثر تیمار های تاریکی، آنتی اکسیدان‌ها، واکشت مکرر و زغال فعال درون محیط کشت روی میزان قهوه‌ای شدن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که که استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک بهترین تیمار جهت کاهش میزان قهوه‌ای شدن بود (Corduk*et al*., 2011).

ریز ازدیادی در محیط کشت تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد و حضور آنها جهت استقرار ریز نمونه و رشد مطلوب بعدی آن ضروری است. ترکیباتی مانند سایتوکینین‌ها و اکسین‌ها جهت استقرار و پرآوری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با وجود گزارش‌های محدود در مورد ارقام گیلاس، بهترین محیط کشت برای گیلاس محیط کشت MS کامل می‌باشد (Zamanipour *et al.*, 2015).

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر تیمارهای تاریکی، سرما، آنتی اکسیدان (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک) و تیمار تاریکی و سرما بر کاهش میزان قهوه‌ای شدن و تعیین بهترین غلظت تنظیم کننده رشد جهت شاخه زایی و ریشه‌زایی تعدادی از ارقام گیلاس انجام گرفت.

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی

این آزمایش در بهار سال ۱۳۹۸ روی تعدادی از ارقام گیلاس در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مشهد انجام شد. مواد اولیه مورد استفاده جهت تهیه ریز نمونه شامل جوانه‌های ارقام گیلاس تکدانه و عدلی بود که از درختان بارده ۱۰ ساله در اردیبهشت ماه از ایستگاه تحقیقات کشاورزی گلمکان واقع در۴۰ کیلومتری شمال غربی مشهد با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۹ دقیقه و طول جغرافیایی ۵۹ درجه و ۱۷ دقیقه و در ارتفاع ۱۱۷۶ متری از سطح دریا با آب و هوای معتدل، و بافت خاک شنی لومی تهیه شد. جهت جلوگیری از کاهش رطوبت، برگ‌ها به سرعت حذف شدند و نمونه‌ها درون پارچه مرطوب در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

برای این منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۱۰ تکرار (هر شیشه ۳ ریز نمونه) با دو فاکتور، فاکتور اول رقم در دو سطح (رقم عدلی و تکدانه) فاکتور دوم استفاده از تیمارهای تاریکی، محلول آنتی اکسیدان (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک)، سرما و تیمار تاریکی و سرما روی کاهش میزان قهوه‌ای‌شدن ریز نمونه گیلاس انجام گرفت.

شرایط کشت

ریز نمونه‌های تک‌گره (به طول ۱ سانتی‌متر) با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر، استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ برای ۲۰ دقیقه و بیش از سه بار شستشو با آب مقطر ضدعفونی شدند و در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی عناصر ماکرو و میکرو، ویتامین‌ها و ۶ گرم در لیتر آگار برای جامد شدن محیط کشت و۳۰ گرم ساکارز در هر لیتر بدون تنظیم‌کننده رشد به عنوان محیط کشت پایه مورد استفاده قرار گرفت. pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم شد. سپس محیط کشت‌ها در دمای ۱۲۱ و فشار ۱/۳ اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو (A-2000, Abzarteb Iran) شدند. تمام مراحل کشت زیر هود و شرایط استریل انجام شد.

آزمایش اول

تیمار سرما

در این آزمایش اثر سرما بعد از کشت جوانه‌ها درون

محیط کشت به عنوان عامل کاهش دهنده فنل مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها بعد از کشت شدن درون لوله آزمایش به مدت 7 روز در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و بعد از آن به اتاق رشد (GROUC- P.O. Box 16655-115 THEHRAN- IRAN) با دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

تیمار تاریکی

در این آزمایش اثر تاریکی بعد از کشت جوانه‌ها درون محیط کشت به عنوان عامل کاهش دهنده فنل مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها بعد از کشت شدن درون لوله آزمایش، به مدت هفت روز داخل نایلون سیاه در اتاق رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تیمار سرما و تاریکی

در این آزمایش اثر تاریکی و سرما (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به عنوان عامل کاهنده میزان فنل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها بعد از کشت دورن شیشه داخل یخچال درون نایلون سیاه به مدت هفت روز قرار گرفتند سپس به اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

تیمار محلول آنتی اکسیدان

در این آزمایش اثر آنتی اکسیدان‌ها به عنوان عامل کاهش دهنده قهوه‌ای شدن بافت ریزنمونه گیلاس در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیدآسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سیتریک به محیط کشت پایه (MS) اضافه شد (به دلیل عدم پایداری آن به دمای بالا، بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت، زیر هود توسط استریلیزاسیون فیلتری، به محیط کشت اضافه شد). نمونه‌های کشت شده پس از۵ هفته مورد بررسی قرار گرفتند.

روش سنجش میزان قهوه ای شدن

برای اندازه‌گیری میزان قهوه‌ای شدن به۱۰گرم از ریز نمونه قهوه‌ای شده ازت مایع افزوده و در ۲۰ میلی‌گرم آب مقطر همگن کرده و به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Universal 320 R- Hettich- USA) شد. یک ساعت بعد از همگن‌شدن به ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره رویی ۱۵میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه کرده و تکان می‌دهیم و دوباره برای ۱۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. شدت قهوه‌ای شدن با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۴۰ نانومتر قرائت گردید (Olivier *et al.*, 1994).

آزمایش دوم- ریز ازدیادی

در این مرحله نمونه‌هایی که رشد کافی داشتند به محیط کشت پرآوری منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده محیط MS به همراه ۳ سطح غلظت BAP (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و دو سطح غلظت IBA (صفر و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) بود. در این مرحله از ظروف شیشه‌ای بزرگتر (۱۰۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. نمونه‌ها به اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۱۲۰۰-۱۰۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۵درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. دو ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت پرآوری تعداد شاخساره‌های تولید شده برای تعیین میزان پرآوری اندازه‌گیری شد.

پس از گذشت سه ماه از کشت ریزنمونه، پس از بازکشت شاخساره‌ها، ریشه‌دهی در محیط‌های کشت MS با تنظیم کننده رشد IBA (ایندول تری بوتریک اسید) با غلظت‌های (صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (نفتالین استیک اسید) با غلظت‌های (صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به صورت تیمار (T1: بدون تنظیم‌کننده رشد، T2: ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، T3: ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، T4: ۱ میلی‌گرم NAA و ۲ میلی‌گرم در لیترIBA) همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۶ گرم آگار که pH آن بر روی ۵/۷ تنظیم شده بود کشت شدند. برای هر تیمار ۴۲ نمونه (شش تکرار با هفت ریز نمونه) استفاده شد و درصد ریشه‌زایی محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۰) و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد و نمودارها توسط نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

اثر تیمارهای مختلف کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه گیلاس

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تیمارها و اثر متقابل رقم در تیمار تاریکی، محلول آنتی اکسیدان (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک)، سرما و تیمار تاریکی و سرما در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌داری بود. (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف در کاهش قهوه‌ای شدن ریز نمونه های گیلاس.

Table 1. Results of variance analysis effect of different treatments on reducing of browning in sweet cherry explants.

Source of variation	d.f.	Mean of squares
		Browning
Treatment	4	1.72**
Cultivar	1	0.012ns
Treatment ×Cultivar	4	0.79**
Error	20	0.003
C.V (%)		8.48

**، ns: به‌ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

**, ns: Significantly difference at 1% and no significantly difference, respectively.

بیشترین و کمترین میزان قهوه‌ای شدن در رقم عدلی به ترتیب مربوط به تیمار سرما با میانگین جذب OD/440=۱/۰۸nm و تیمار آنتی‌اکسیدان (اسید آسکوربیک و اسید سیتریک) با میانگین جذب OD/440=۰/۱۱۴nm بود که با تیمار تاریکی با میانگین جذب OD/440=۰/۱۷nm اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱).

در رقم تکدانه بیشترین و کمترین میزان قهوه‌ای شدن مربوط به تیمار سرما با میانگین جذب OD/440=۰/۸nm و تیمار آنتی‌اکسیدان با میانگین OD/440=۰/۱۲ بود (شکل ۱). به طور کلی بیشترین میزان قهوه‌ای شدن (بدون در نظر گرفتن شاهد) در رقم عدلی و تکدانه در تیمار سرما مشاهده شد که کمترین تاثیر را در کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه داشت (شکل ۲) .

خاصیت آنتی اکسیدانی ناشی از سنتز اسید آسکوربیک موجب کاهش مواد فنلی در کالوس‌ها و محیط کشت گردید (Vahdatpor *et al.,* 2009). محققان زیادی مشاهده کردند که با استفاده از اسید آسکوربیک می‌توان تا میزان زیادی از فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز که به شدت باعث قهوه‌ای شدن می‌گردد، ممانعت کرد (Alturki *et al.*, 2013؛ Hung *et al.*, 2002).

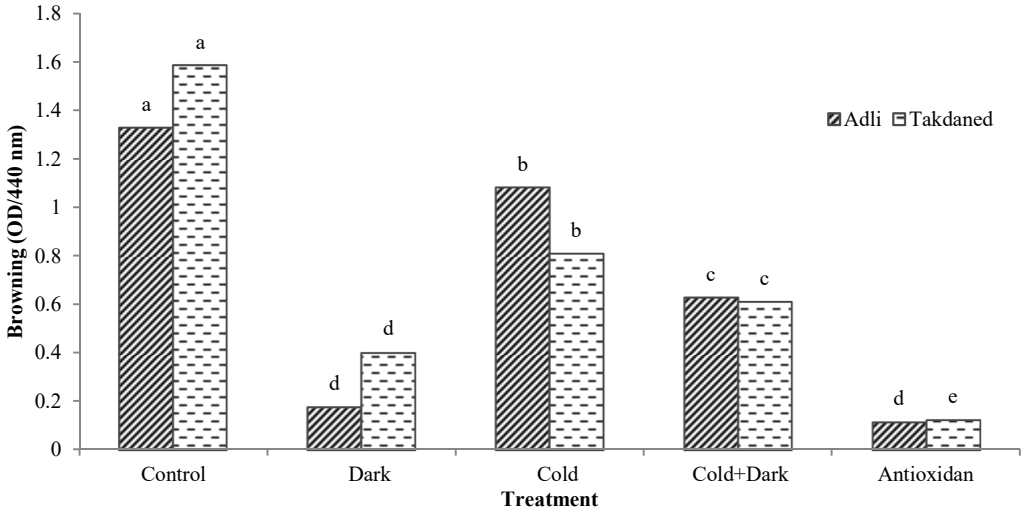
Ndakidemi *et al.* (2014) گزارش کردند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند آنتوسیانین‌ها، فلاونوئید و اسیدآسکوربیک بر رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده غلبه می‌نماید و رابطه مستقیمی بین میزان رادیکال‌های آزاد و غلظت مواد فنلی در گیاه وجود دارد. از طرفی اثر اسید آسکوربیک بر میزان باززایی و تولید شاخساره بستگی به گونه گیاهی، نوع ریز نمونه و نوع محیط کشت دارد.

در مطالعه‌ای روی گیاه *Protea cynaroides* گزارش شد که با اضافه کردن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سیتریک تا میزان زیادی می‌توان از فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز که باعث قهوه‌ای شدن بافت می‌شود، ممانعت کرد (Wu, 2004). در بررسی اثر تیمارهای مختلف بر کنترل فنل ریز نمونه‌های انجیر گزارش کردند که تیمار اسید آسکوربیک به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت با حداقل تعداد واکشت ۳-۲ بار به عنوان بهترین تیماربه دست آمد (Hesami *et al*., 2016). محققان به منظور کاهش تولید ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن در ریز نمونه از عصاره گلرنک که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است،استفاده کردند (Elmor *et al*., 2004).

Poudayal *et al.,* (2008) گزارش کردند استفاده از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم اسید آسکوربیک در محیط کشت، ۰/۰۲ درصد پلی ونیل پیرولیدن (PVP)، یکی

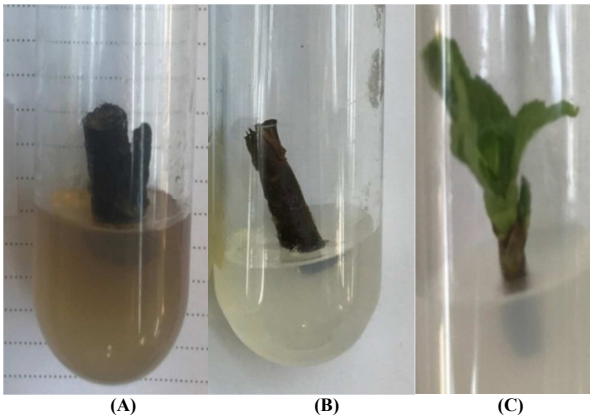
از بهترین تیمارها برای کنترل قهوه‌ای شدن و بقای ریز نمونه‌های گلابی است.Zhang *et al*., (2003) به منظور کنترل قهوه‌ای شدن شاخه گردو استفاده از تیمار تاریکی در ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز را پیشنهاد کردند. Alyu, (2005) اضافه کردن زغال فعال به محیط کشت و تیمار تاریکی برای ۷ روز در ریز نمونه‌های بادام هندی را عامل موثر در کاهش قهوه‌ای‌شدن و بقای ریز نمونه دانست.

استفاده از تیمار تاریکی تا یک هفته از قهوه‌ای‌شدن ریز نمونه جلوگیری کرد اما پس از قرار گرفتن ریز نمونه‌ها در اتاقک رشد با فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی ریز نمونه‌ها به سرعت قهوه‌ای شدند. نتایج این تحقیق با پژوهش Corduk *et al.* (2011) مطابقت داشت آنها گزارش کردند که تاریکی روی مشکل قهوه‌ای شدن تا زمانی که نمونه‌ها درون پوشش نایلون سیاه قرار دارند موثر است و پس از انتقال به اتاقک رشد قهوه‌ای شدن تسریع می‌شود.در پژوهشی شرایط تاریکی ۱۴۴-۹۶-۴۸ ساعت برای جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌های گلابی مورد ارزیابی قرار گرفت. Poudayal *et al.* (2008) نشان دادند تیمار ۹۶ ساعت تاریکی بهترین تیمار جهت کنترل قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها بود.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و تیمارهای سرما، تاریکی، آنتی اکسیدان و سرما +تاریکی روی کاهش میزان قهوه‌ای‌شدن ریز نمونه گیلاس.

Figure 1. Mean comparison interaction effect of cultivar and cold, dark, anti oxidant, cold+dark treatments on reduction of browning in sweet cherry explant.



شکل ۲. A) تیمار شاهد، B) تیمار سرما، C) تیمار آنتی‌اکسیدان (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک در رقم تکدانه گیلاس).

Figure 2. A) Control treatment; B) Cold treatment; C) Anti oxidant treatment (100 mg/l Ascorbic acid and150 mg/l citric acid) in Takdane sweet cherry.

مشکل قهوه‌ای‌شدن در نتیجه تولید ترکیبات فنلی و اکسیداسیون آنها می‌باشد که از ریز ازدیادی جلوگیری می‌کند. ترکیبات فنلی تحت تاثیر تنش‌های مختلف از جمله تنش بریدگی تولید و منجر به قهوه‌ای‌شدن بافت گیاه می‌شود. به‌کاربردن تکنیک‌هایی موثر به منظور کاهش تولید فنل که منجر به کاهش میزان قهوه‌ای‌شدن گیاه و افزایش‌دادن مقاومت بافت‌ها می‌شود، ضروری است. در پژوهشی اثر تیمارهای مختلف بر شاخص قهوه‌ای‌شدن کالوس گیاه دارویی *Sideritis trojana* Bornm مورد بررسی قرار گرفت و گزارش کردند که تیمار اسیدآسکوربیک و تاریکی موثرترین تیمار بر کاهش قهوه‌ای‌شدن ریز نمونه می‌باشد (Corduk *et al*., 2011) که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

نتایج آزمایش اثر نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بر ریزازدیادی

مقایسه میانگین میزان پرآوری (تعداد شاخساره) رقم تکدانه و عدلی در محیط کشت MS با غلظت‌های مختلفBAP و IBA برحسب میلی‌گرم در لیتر نشان داد که رقم‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت واکنش متفاوتی نشان دادند (جدول۲). بهترین غلظت تنظیم‌کننده رشد در مرحله پرآوری ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیترBAP به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA جهت شاخه‌زایی تعیین شد.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA در محیط کشت MS بر میزان پرآوری (تعداد شاخساره در هر ریزنمونه پس از دو ماه) رقم تکدانه و عدلی گیلاس.

Table 2. Mean comparison effect of different concentrations of BAP and IBA in MS medium on shoot proliferation (shoot number/ explant/ 2months) of sweet cherry cultivars Adli and Takdaneh.

Cultivars	BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	
		0	0.01
Takdaneh	0	0.33 ^{d}	1 ^{d}
	1	2 ^{c}	4.33 ^{b}
	2	2.6 ^{c}	5.6 ^{a}
Adli	0	0.33 ^{d}	2 ^{c}
	1	1.33 ^{c}	3.33 ^{b}
	2	3 ^{b}	5 ^{a}

در هر ستون میانگین‌هایی با یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column means followed by a common letters, are not significantly different at 5% of probability level.

از آنجایی که یکی از راه‌های تکثیر پایه و ارقام گیلاس استفاده از کشت درون شیشه‌ای است. با بررسی هورمون‌های مختلف در هر مرحله از رشد BAP و IBA جهت شاخه‌زایی و ریشه‌زایی توصیه می‌شود (Sheidayie *et al*., 2022). بیشترین تعداد شاخساره در رقم تکدانه و عدلی به‌ترتیب با میانگین ۵/۶ و ۵ ریزشاخه بود. کمترین شاخه‌زایی با میانگین ۰/۳۳ ریزشاخه در تیمار فاقد تنظیم‌کننده‌های رشدی بود. افزایش غلظت BAP در محیط کشت موجب افزایش میزان پرآوری شاخساره‌ها شد. سایتوکینین‌ها برای تقسیم سلولی از اهمیت بالایی برخوردارند و به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش شاخه‌زایی می‌شوند (Sabouni & Shekafande, 2015). در مطالعات درون‌شیشه‌ای مشابه گزارش کردند که با افزایش غلظت BAP درصد پرآوری، تعداد شاخساره و کیفیت شاخساره‌های تولیدشده افزایش می‌یابد، اما غلظت BAP را تا حدی می‌توان افزایش داد، زیرا بالاتر از حد بهینه، به تعداد زیادی شاخساره با کیفیت ضعیف منجر می‌شود که در مراحل بعدی، رشد و زنده‌مانی ضعیفی دارند (Shabbir *et al*., 2009; Hajian *et al*., 2015).

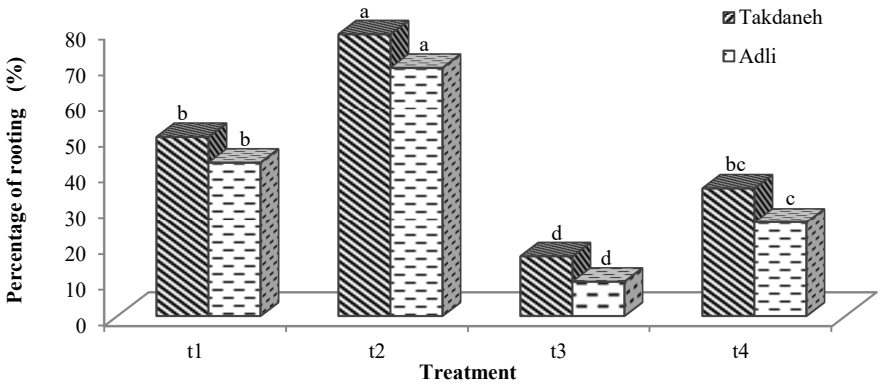
Sulusloglu (2012) افزایش ۵۰ درصدی در پرآوری را در پایه‌های پاکوتاه گیلاس در محیط کشت MS حاوی ۱/۵میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین گزارش نمودند که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

بررسی نتایج حاصل از اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد تشکیل ریشه، نشان داد که بین فاکتورها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت. بیشترین درصد ریشه‌زایی در رقم تکدانه با میانگین ۷۸/۷۳ درصد و عدلی با میانگین ۶۹/۴ درصد در تیماردوم حاوی (۲ میلی‌گرم در لیتر IBA) بود. کمترین درصد ریشه‌زایی در رقم تکدانه و عدلی به ترتیب با میانگین ۱۶/۶ درصد و ۹/۵۲ درصد در تیمار سوم حاوی (۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) مشاهده شد (شکل ۳).

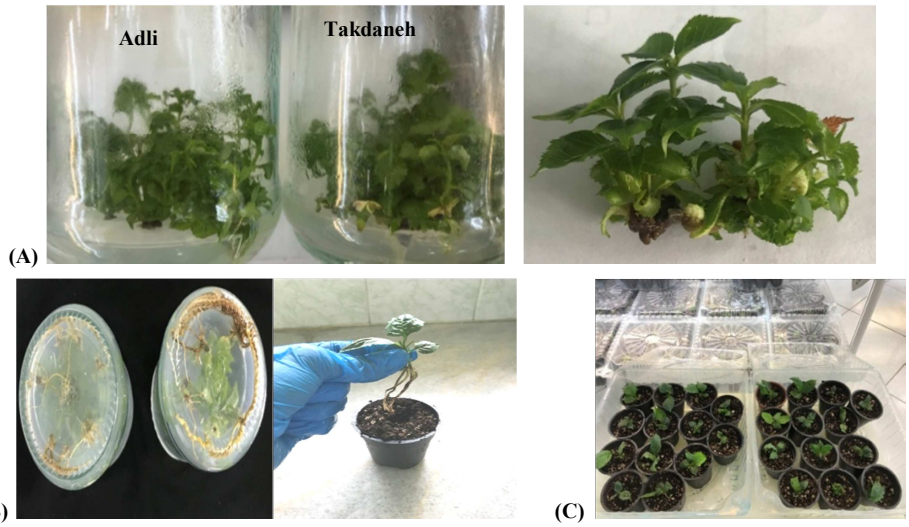
ریشه‌دارکردن ریزنمونه‌ها اغلب با چالش مواجه می‌باشد. بدین ترتیب اعمال تیمارهای هورمونی به‌ویژه اکسین‌ها برای القای ریشه‌زایی در گیاهچه‌ها به طریقی که تعداد ریشه کافی تولید کنند و پس از استقرار در

خاک توانایی خوب داشته باشند، دارای اهمیت می‌باشد (Hartmann *et al*., 1997). Hosseinpour *et al.* (2015) گزارش کردند که ایندول بوتریک اسید، معمول‌ترین اکسین برای تشکیل ریشه است. Mansseri-Lamriouri *et al.* (2013) بیان نمودند، غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید در گیلاس وحشی میزان ریشه‌زایی را افزایش می‌دهد.

بعد از ۴۰ روز، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به منظور سازگاری به اتاق سازگاری منتقل گردیدند. در این مرحله گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت ۱:۱ منتقل و تحت شرایط رطوبت نسبی ۸۵ درصد، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۳۰ روز در اتاق سازگاری نگهداری شدند. از هفته دوم هوادهی و تغذیه گیاهچه‌ها آغاز شد. در روز اول هوادهی به مدت پنج دقیقه گیاهچه‌ها در معرض هوای آزاد قرار گرفتند و به مدت دو هفته هر روز میزان هوادهی افزایش یافت تا اینکه گیاهان به سطحی از سازگاری رسیدند که قابل انتقال به گلخانه بودند. تعدادی از گیاهان بر اثر خشک‌شدن سریع از بین رفتند، با این‌حال گیاهان با نرخ زنده‌مانی ۸۰ درصد به شرایط محیطی سازگار شدند (شکل ۴).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر سرما، تاریکی، آنتی اکسیدان و سرما +تاریکی بر درصد ریشه زایی ریز نمونه های گیلاس.
Figure 3. Mean comparison effect of cold, dark, anti oxidant, cold+dark on percentage of rooting in sweet cherry explants.



شکل ۴. مراحل انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده گیلاس از محیط درون شیشه‌ای به بستر خاک به منظور سازگاری. A) شاخه‌دهی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، B) ریشه‌دهی در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، C) مرحله سازگاری
Figure 4. Transfer steps of rooted explants of sweet cherry from *in-vitro* to soil for adaptability.
A) Shooting explants on MS medium containing BAP (2 mg/l) and IBA (0.01mg/l); B) rooting treatment (2 mg/l); C) adaptability phase.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی، نتایج نشان داد استفاده از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک در محیط کشت MS به‌طور معنی‌داری میزان قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه و محیط کشت را کاهش داده است. به‌نظر می‌رسد که استفاده از آنتی اکسیدان‌ها (اسیدآسکوربیک و اسید سیتریک) می‌تواند تا میزان زیادی از فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز که به‌شدت باعث قهوه‌ای‌شدن می‌گردد ممانعت کند. بهترین غلظت تنظیم‌کننده رشد برای محیط کشت MS در مرحله پرآوری ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA جهت شاخه‌زایی تعیین شد. همچنین بهترین غلظت جهت ریشه‌دهی تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بود.

سپاسگزاری

از مساعدت‌های مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی در انجام این پروژه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Akbari, S., Bernard, F. & Godarzi, R. (2014). *Effect extract (Carthamus tinctorius L.) on explants browning in-vitro conditions.* M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture Shahid Beheshti University, Iran. (in Farsi).
2. Aliyu, O. M. (2005). Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding an appraisal. *African Biotechnology*, 4(13), 1485-1489.
3. Turki, S., Shehata, W. F. & Aldaej, M. I. (2013). Influence of nutrient on antioxidants production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in vitro. *Asian Journal of Plant Science*, 12(3), 119-127.
4. Amiri, H., Mousawi, M. & Torahi, A. (2018). The effect of various factors on browning of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) explants in vitro. *Plant Production*, 18(1), 33-45. (in Farsi).
5. Corduk, N. & 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.
6. Elmore, H., Samples, B., Sharma, S. & Harrison, M. (2004). Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbic stability in plant tissue culture media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 20,131-135.
7. Ganji Moghaddam, E. & Bouzari, N. (2009). *Sweet cherry.* Tehran, Gholami Press, 344p. (in Farsi).
8. Ganji Moghaddam, E., Jalali, A., Irvani, A. & Bina, S. (2020). Comparison of quantitative and qualitative characteristics of promising Mashhad-86 genotype with some of early ripening sweet cherry cultivars. *Iranian Journal of Horticulture Science*, 50(4), 891-899. (in Farsi).
9. Hajian, S., Alizadeh, S. & Zare, F. (2015). Effect of BAP and TIBA on shot proliferation rose Full Haves cultivar *in vitro* culture. *Journal of Horticultural Science*, 29(1), 111-118.
10. Hartmann, H.T., Kester, D. E., Daviesm, F.T. & Geneve, R.L. (1997). *Plant propagation principles and practices* (2th ed.). Prentice Hall.
11. Hesami, M., Daneshvar, M. H. & Lotfi-Jalalabadi, A. (2016). Activated charcoal, ascorbic acid and phloroglucinol control callus browning and Induce indirect organogenesis in *Ficus religiosa* L. *Science of Ornamental Plants*, 1(2), 51-58. (in Farsi).
12. Hosseinpour, B., Bouzari, N., Didar, Z., Masoumian, M., Ghaemmaghami, S.A., Ebrahimi, A., Mirabbasi, S. M. & Farvardin, A. (2015). High frequency *in vitro* propagation of M × M60, a cherry rootstock: the effects of culture media and growth regulators. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 4 (2), 28-36. (in Farsi).
13. Huang, L.C., Lee, Y.L., Huang, B.L., Kou, C.I. & Shaw, J.F. (2002). High polyphenol oxidase activity and low titration acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cell Development Biologycal Plant,* 38, 358-365.
14. Leng, P., Su, S., Wei, F., Yu, F. & Duan, Y. (2009). Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. *Acta Horticulture*, 106, 337-343.
15. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
16. Ndakidemi, C., Mneney, E. & Ndakidemi, P.A. (2014). Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning *in vitro* culture of *Brahylaena huillensis* L. nodal segments. *Plant Science*, 5, 187-191.

17. NuriNas, M. (2003). Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 189-194.
18. Oliviera, S., Guerra, N., Maciel, M. & Livera, A. (1994). Poly phenol oxidase activity, poly phenols concentration and browning intensity during soursop (*Amonam uricafa*, L.) maturation. *Food Science*, 59(5), 1050-1053.
19. Pan, M. J. & Staden, J. V. (1999). Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. *Plant Growth Regulation*, 29(3), 135-141.
20. Poudayal, B. K., DU, G., Zhang, Y., Liu, J. & Shi, Q. (2008). Studies on browning problem and phenols content on shoots of Yali, Aikansui and Abbe fetel pears for *in vitro* culture. *Frontiers of Agriculture*, 2(3), 321-330.
21. Sabouni, N. & Shekafande, A. (2015). Effect of plant growth regulator *in vitro* proliferation of two species of native raspberry. In: Proceedings of *9th International on Horticultural Science*, 5-8 Feb., Chamran University, Ahvaz, Iran, pp.1-4. (in Farsi).
22. Shabbir, A., Hameed, N., Ali, A. & Bajwa, R. (2009). Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose. *Journal of Botany*, 41(6), 2877-2882.
23. Sharma, R. & Singh, S. (2002). Etiolation reduces phenolic content and poly phenol oxidase activity at the pre-culture stage and *in vitro* exudation of phenols from mango explants. *Tropical Agriculture,* 79, 94-99.
24. Sheidayie, T., Ganji Moghaddam, E., Atar, Sh. & azimzade, M. (2022). Evaluation the effect of different concentrations of agar and carbohydrate on the micro-propagation of PHL-C, a dwarf cherry rootstock. *Iranian Journal of Horticulture science*, 52 (4), 977-989. (in Farsi).
25. Sulusoglu, M. (2012). Development of embryo culture protocol for cherry laurel *(Prunus laurocerasus* L.). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 10, 47-352.
26. Yang, H., Zhou, C., Wu, F. & Cheng, J. (2010). Effect of nitric oxide on browning and lignification of peeled bamboo shoots. *Postharvest Biology and Technology*, 57, 72-76.
27. Vahdatpour, F., Mashayekhi, K. & PiriZirkuhi, M. (2009). Investigation of antioxidant effect turmeric in comparing with active coal and ascorbic acid in cultural medium of *Ulmas pavrifolia* L. Jasq callus. *Plant Production*, 16(2), 2-14. (in Farsi).
28. Vahedi, Z., Rahpima, S. & Zoali, J. (2017). Investigation effect acid citric and acid ascorbic on browning explants leaf *Corylus avellana* L. in hairy root medium. In: proceedings *8th International Congress on Sustainable Agricul*ture.1 May., Tehran, Iran, pp 9. (in Farsi).
29. Wu, H.C. (2004). Reducing oxidative browning during *in vitro* establishment of *Protea cynaroides*. *Scientia Horticulturae*, 100(4), 355-35.
30. Zamanipour, M., GanjiMoghadam, E., Tehranifar, A. & Abedi, B. (2015). The effects of media, plant growth regulators & apex size on the success of meristem culture in *Prunus avium* L. cv Pishras Mashhad*. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences,* 5 (1), 924-929.
31. Zhang, W. F., Gao, J. S., Ou, Y. H. &Yang, P. W. (2003). Primary study on browning control in tissue culture of pellicular walnut. *Deciduous Fruits*, 3, 4-7.