ریزازدیادی گردوی بالغ ایرانی *(Juglans regia)* به شیوهٔ کشت بافت

میترا امام[1]، *معصومه ایزدپناه*[1]

چکیده

به هدف بررسی تکثیر گردوی ایرانی، جوانهٔ انتخابی از پایه‌های بالغ موجود در رویشگاههای طبیعی گیاه و در تمامی فصول سال برداشت شد. عملیات سترون‌سازی در تیمارهای گوناگون، به دستیابی مناسبترین روش ممکن برای سترون کردن جوانه‌ها منجر گردید. این سترون‌سازی شامل غوطه‌ور کردن جوانه‌ها در محلول اتانل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و بعد استفاده از محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱/۵ دقیقه بود. کشت جوانه‌ها در محیطهای واجد غلظتهای متفاوت هورمونی، مطلوبترین محیط را با مناسبترین ترکیب هورمونی برای استقرار و رشد جوانه‌ها تعیین نمود، به‌طوری‌که محیط کشت DKW با هورمون BA در غلظت یک میلیگرم در لیتر برای شاخه‌زایی جوانه‌های گردوی ایرانی به عنوان محیط کشت و هورمون برگزیده، مشخص گردید.

برای فعال کردن جوانه‌های جانبی و افزایش درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها از محیطهای DKW, MS با هورمونهای BA و GA3 به میزان ۰/۵ و ۰/۲۵ میلیگرم در لیتر (به ترتیب)، استفاده شد. در ضمن کاربرد محیط پایه DKW بدون هورمون، در مرحله پیش‌تیمار ریشه‌زایی، در افزایش طول و مقاومت شاخه‌های گردو مؤثر بود.

در مرحله ریشه‌زائی، تیمارهای مختلف و متعددی نظیر: استفاده از هورمونهای خانواده اکسین به تنهایی یا به‌طور تلفیقی، کاهش و افزایش غلظت املاح پرمصرف و قند

۱- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

در محیط کشت، کاربرد زغال فعال، ویتامینها و اسید آمینه‌های مختلف و... در محیط صورت گرفت که به نظر می‌رسد تنها در دو مورد احتمال تمایز آوندی در بافت کالوس (تشکیل پریموردیوم ریشه) امکانپذیر شده است، ولی برای تکمیل نتایج فوق، لازم است تا بررسیهای کامل تشریحی، سلول‌شناختی دربارهٔ یاخته‌های بافت کالوس تشکیل شده در قاعده جداکشتهای به کار رفته در تیمارهای فوق و متمایز ساختن ریشه‌چه در نمونه‌های مزبور، صورت گیرد.

کلید واژه‌ها

ریزازدیادی Micropropagation

کشت سرشاخه‌ای Shoot tip culture

گردوی ایرانی *Juglans regia*

ریشه‌زایی Rhyzogenese

مقدمه و هدف

گردوی ایرانی، از گونه‌های مهم تجارتی و صنعتی سرده گردو محسوب می‌شود و از چوب آن در صنایع چوب، روکش‌سازی، اسلحه و مبل‌سازی (طباطبائی، ۱۳۶۳) و از میوه و روغنش به عنوان خشکبار و نیز در رنگرزی استفاده می‌شود. نحوهٔ معمول تکثیر این گونه از طریق بذر و پیوند است (ثابتی، ۱۳۴۴). در تکثیر گیاه از طریق بذر، افراد جدیدی با صفات ژنتیکی متفاوت از گونه والد تولید شده و درنتیجه این نحوهٔ تکثیر برای پایه‌های حاصل از والد با خلوص ژنتیکی همراه نیست. بنابراین، برای رسیدن به یک ساختار ویژهٔ ژنتیکی از درخت بالغ برگزیده و ازدیاد انبوه آن، به روشهای تکثیر غیرجنسی روی می‌آورند.

توصیه می‌شود که در مورد این گونه، از تکثیر به روش کشت بافت، استفاده شود، چراکه قلمه‌زنی پایه‌های بالغ آن با مشکل روبروست (لطفیان، ۱۳۶۶). در این روش می‌توان از قطعات مختلف گیاه مانند: ساقه، ریشه، برگ و جوانه و نیز لپه و آندوسپرم برای کشت در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود. کشت جوانه از جهت همسانی گیاه حاصل از کشت، به والد آن، اهمیت ویژه‌ای دارد.

سابقه تحقیق:

در زمینه کشت بافت گردو در جهان، نخستین پژوهش در سال ۱۹۶۹ توسط Cumminus و Ashby در مورد شاخه‌های پوست‌دار گردوی سیاه و به هدف رشد کالوس انجام گرفت. Rodriguez (۱۹۸۲)، از قطعات ساقه، لپه و قطعات ریشه نهالهای بذری گردوی سیاه به کالوس و از قطعات کالوس مشتق از لپه و ریشه به ریشه رسید. Chalupa (۱۹۸۱) از گیاهچه‌های حاصل از گره نهالهای بذری به ریشه‌زایی رسید. Driver(۱۹۸۴) از گردوی هیبرید پارادوکس شاخه گرفت و در شرایط خارج از شیشه به ریشه‌زایی رسید.

Mc Granahan(۱۹۸۷)، از کشت جوانه نهالهای بذری به شاخه‌زایی رسید و با غوطه‌ور کردن آنها در مخلوط نمک پتاسیم و تالک به ریشه‌زایی رسید.

Rodriguez(۱۹۸۹)، از محورهای جنینی جوان گردو به شاخه‌زایی و بعد ریشه رسید. Cornu در سال ۱۹۹۱، از گردوی هیبرید به شاخه و بعد ریشه رسید. نصیری (۱۳۷۱)، با کشت لپه و آندوسپرم در محیط کشت به جنین سوماتیکی و شاخه رسید. وحدتی (۱۳۷۴)، از جوانه به شاخه رسید و امکان تمایز دستجات آوندی را در محیط کشت بررسی نمود.

بررسی حاضر با کشت جوانه گیاه در محیطهای کشت متداول به شاخه‌زایی مطلوب رسید و بعد این شاخه‌ها در مرحله ریشه‌زایی تحت ۵۲ تیمار درون‌شیشه‌ای و ۹ تیمار خارج از شیشه قرار گرفتند.

مواد و روشها

مناطق برداشت نمونه در تحقیق اخیر، جنگل واز چمستان نور و جنگل چلیر در خیرودکنار مازندران و جنگل ناو اسالم در گیلان بودند. ارتفاع متوسط منطقه برداشت نمونه حدود ۱۱۰۰ تا ۱۶۰۰ متر از سطح دریا بود.

جوانه در تمام فصول سال برداشت شد و سرشاخه‌ها در قطعات کوچک واجد جوانه در بسته‌بندیهای تمیز و در یخدان به آزمایشگاه محل اجرای طرح منتقل گشتند و با جداسازی جوانه از شاخه، پس از برس کشی با محلول اتانل و مایع ظرفشویی و بعد شستشوی آنها با محلول قارچ‌کش در غلظت یک گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال، برای نیم ساعت، از جوانه‌ها پوسته‌برداری شد.

درمرحله اصلی از محلولهای مختلف مانند اتانل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم، پودر کلر فعال و محلول کلرور مرکوریک با درصدهای مختلف و در زمانهای متفاوت استفاده شد. فصل برداشت، اندازه جوانه و محل برداشت از پایه، بر نوع تیمار

سترون‌سازی مؤثر بود. پس از ضدعفونی، نمونه‌ها در آب مقطر سترون حاوی اسیداسکوربیک قرار گرفت. سپس جوانه‌ها با قطع انتهای قهوه‌ای قاعده و حذف زوائد جانبی شاخه در اندازه‌های یک سانتیمتری در آمده و در محیط کشتهای آماده، کشت شدند.

از محیط کشتهای DKW[۱], MS[۲] در حضور هورمونهای BA[۳] و IBA[۴] برای استقرار و کشت جوانه‌ها استفاده شد. قابل ذکر است که برای جذب ترشحات فنلیک از مقطع نمونه‌ها، آنتی‌اکسیدانتهای مختلف مانند اسید اسکوربیک و PVP[۵] به ترتیب در غلظتهای ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. نمونه‌های ضدعفونی شده در زیر هود و با حفظ شرایط کاملاً سترون و با قطع انتهای قهوه‌ای قاعده‌شان در محیط کشت مستقر شده و در شرایط خاص اتاق کشت با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و حرارت ۲۵ درجه و تشعشع لامپهای خورشیدی ۳ تا ۴ هزارلوکس قرار گرفتند.

بازکاشت جوانه‌ها در هفته اول، روزانه و پس از آن به‌طور هفتگی تا یکماه انجام گرفت. پس از این مدت نمونه‌های زخمی و آلوده از مجموعه کشتها حذف شده و تنها جوانه‌های سالم بازکاشت شدند. غلظتهای هورمونی استفاده شده در مرحلهٔ شاخه‌زایی عبارت بودند از: ۰/۱ تا ۱ میلیگرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلیگرم در لیتر IBA. آزمایش با استفاده از طرح آماری فاکتوریل با ۶ تیمار هورمونی و دو تیمار محیطی با ۲۴ تکرار در قالب بلوکهای کاملاً تصادفی انجام شده بعد از سه بازکاشت ماهیانه، شاخه‌زایی و رشد طولی شاخه‌ها ثبت و یادداشت شدند. داده‌های حاصل مورد محاسبه آماری قرار گرفتند. برای فعال کردن جوانه‌های جانبی و رشد شاخه‌های فرعی از روش تقسیم

1- DKW= Driver & Kuniyuki medium
2- MS = Mourashige & Skooge medium
3- BA= 6-Benzyl Amino purine
4- IBA = Indole Butyric Acid
5- Pvp= Poly vinil pyrolidone

شاخه‌ها و کاربرد هورمون جیبرلیک اسید در محیط کشت استفاده شد و در نهایت مجموعه‌ای از شاخه‌های فعال بدست آمدند.

در مرحله ریشه‌زایی ابتدا شاخه‌ها در محیط فاقد هورمون برای یک تا دو هفته بازکاشت شده و بعد تیمارهای مخصوص ریشه‌زایی در مورد آنها اعمال گردید. این تیمارها عبارت بودند از: کاربرد هورمونهای خانواده اکسین در غلظتهای مختلف به تنهایی یا به طور تلفیقی، تغییر در میزان قند محیط، کاهش غلظت ماکروالمانها در محیط، افزودن اسید آمینه‌ها و ویتامینهای اضافی در محیط، استفاده از ترکیبهای محرک رشد ریشه از قبیل عصاره لپه گردو، اوره و...، کاربرد محیط کشت مایع و محیط دولایه، استفاده از آنتی‌اکسیدانتها از قبیل زغال فعال، اسید آسکوربیک و PVP در محیط.

در مورد دو تیمار ریشه‌زایی کالهای به ظاهر فعالی بدست آمد که با انجام تثبیت، برش‌گیریهای میکروتومی و رنگ‌آمیزی با محلول تولوئیدین بلو، با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند (شرح این دو تیمار در قسمت نتایج آورده شده است).

نتایج و مشاهدات

در مرحلهٔ سترون‌سازی، کاربرد محلول اتانل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و بعد استفاده از محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱/۵ دقیقه بهترین نتیجه را پدید آورد. استفاده از سایر محلولهای ضدعفونی مانند هیپوکلریت سدیم و پودر کلر فعال تأثیر مثبتی بر سترون‌سازی نمونه‌ها نداشتند (جدول ۱). فصل پائیز مطلوبترین وضعیت را از نظر درصد زنده‌مانی و استقرار جوانه‌ها در محیط نشان داد (تصویر شمارهٔ ۱).

از نظر اندازه جوانه‌های مورد بررسی، جوانه‌های کوچک فلس گرفته، بهترین پاسخ را به تیمارهای سترون‌سازی از خود نشان دادند. برداشت جوانه‌ها از قسمتهای پائینی نسبت به قسمتهای بالایی پایه جواب مطلوبتری داشتند (جدول ۲). استفاده از آنتی‌اکسیدانتها در محیط، با جذب ترشحات فنلی نمونه‌ها، نقش مؤثری در زنده‌مانی

نمونه‌ها داشتند.

با توجه به نتایج مربوط به جدول تجزیه واریانس میانگین مربعات شاخه‌زایی و رشد طولی (جدول شمارهٔ ۳)، تنها میانگین شاخه‌زایی تحت تأثیر متقابل عوامل محیط کشت و هورمون، معنی‌دار بوده و می‌توانست جهت مقایسه، تحت آزمون دانکن واقع شود.

جدول شمارهٔ ۴، نشانگر آن است که بهترین نتایج شاخه‌زایی در محیط کشت DKW و با غلظت BA:۱mg/lit (تصویر شمارهٔ ۲) حاصل شده است. در محیط MS، شاخه‌زایی مطلوب در غلظت BA:۰/۱mg/lit و IBA:۰/۰۱mg/lit (نمودار شمارهٔ ۱)، بدست آمد.

در مرحله ریشه‌زایی تنها در مورد دو تیمار کالهای به ظاهر فعالی بدست آمد (تصویر شمارهٔ ۳). این دو تیمار عبارت بودند از:

۱- محیط DKW با نمک کلرور کلسیم در ۱/۵ غلظت عادی و سایر نمکهای پر مصرف در ۱/۲ غلظت به همراه ۲۰۰ میلیگرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات و ۵۰ گرم بر لیتر از عصاره لپه گردو و ۳ میلیگرم بر لیتر از IBA.

۲- محیط MCM با $\frac{1}{2}$ غلظت از عناصر پرمصرف همراه ۱/۵ گرم در لیتر اوره و ۱ گرم در لیتر زغال فعال و ۴۰ گرم در لیتر ورمیکولیت در ترکیب محیط و NAA[1] در ۲/۷ میکرومول، که با انجام برش‌گیری میکروتومی، شروع تشکیل پریموردیوم ریشه را در آنها شاهد بودیم (تصاویر شمارهٔ ۴ و ۵)، ولی در مورد تحریک این یاخته‌ها به رشد به بررسیهای کاملتری نیاز است.

بحث

1- NAA = Naphthalene Acetic Acid

گزارشهای متعددی، دربارهٔ تفاوت زیاد اندامزایی در گونه‌های مختلف تیره گردو (Juglandaceae) وجود دارد که تقریباً تمامی آنها بیانگر این موضوع هستند که استقرار و ریشه‌زایی گونه گردوی ایرانی *(J. regia)* در محیط کشت، نسبت به سایر گونه‌های گردو با مشکلات عدیده‌ای نظیر آلودگیهای نهان نمونه و طویل شدن آهسته شاخه‌ها روبرو است. ریزازدیادی گردوی ایرانی با کشت جوانه از پایه‌های بالغ برگزیده موضوع این بررسی بوده که اهمیت خاصی در جهان و ایران دارد.

ریزنمونه‌های مورد استفاده از پایه‌های موجود در رویشگاههای طبیعی گیاه در شمال ایران تأمین گشته است و به همین دلیل نتایج مربوط به فصل برداشت، نحوه سترون‌سازی و دامنه غلظت هورمونهای به کار رفته در این تحقیق، برای اولین بار از ایران گزارش می‌گردد.

محلولهای ضدعفونی کننده مختلف مانند: هیپوکلریت سدیم و پودر کلر فعال در غلظتهای زیاد و زمانهای طولانی، با افزایش ترشحات فنلی، از قاعده نمونه‌ها، در قهوه‌ای شدن و مرگ بافت جوانه، مؤثربوده‌اند، درحالی‌که محلول کلرورمرکوریک با وجود سمی بودن شدید آن، خاصیت ضدعفونی کننده بسیار قوی داشته و کاربرد آن در زمانهای کوتاه می‌تواند در حذف آلودگیهای میکروبی نمونه‌ها مؤثر باشد.

پاییز مناسبترین فصل برای استقرار ریزنمونه‌ها، تشخیص داده شد، زیرا جوانه‌ها به دلیل وضعیت فیزیولوژیکی خاص حاکم بر بافتها و حالت فلسهای پوششی دور جوانه‌ها در این فصل، در برابر تیمارهای سترون‌سازی، جواب مساعدتری می‌دهند. در حالی‌که در بهار و تابستان به دلیل رشد فعال جوانه‌ها و عدم وجود پوسته‌های محافظ در اطراف آنها سرعت نفوذ محلولهای ضدعفونی کننده در بافت، زیاد بوده و غلظتهای زیاد محلول، به پوسیدگی و مرگ بافتها منجر شده و غلظتهای کم آن، تأثیری بر حذف آلودگیهای نمونه ندارد. در مورد اندازه جوانه، به نظر می‌رسد که هرچه پوسته‌برداری آنها بیشتر صورت بگیرد نمونه‌ها در برابر تیمارهای سترون‌سازی پاسخ بهتری خواهند داد. زیراکه از تراکم آلودگیهای احتمالی در فواصل پوسته‌ها کاسته می‌شود. در مورد

شاخه‌زائی، مناسبترین محیط کشت، DKW و بهترین غلظت هورمونی، ۱ میلیگرم در لیتر BA گزارش شده است. Cornu (۱۹۹۱) پژوهش خود را با جوانه‌های گردوی هیبرید در همین محیط انجام داد. رشد جوانه‌ها در محیط MS واجد BA نتایج مثبتی را از نظر شاخه‌زایی و رشد قطری و طولی مناسب داشته است. Meynier در ۱۹۸۵ در مورد سرشاخه‌های گردوی هیبرید نتایج مشابهی را گزارش کرده است.

کاربرد هورمون جیبرلیک اسید همراه BA در افزایش رشد طولی شاخه‌های جانبی گردو مؤثر بود، Mc Granahan (۱۹۸۷) در مورد گردوی هیبرید و در محیط DKW نتایج مشابهی را بدست آورده است.

مقایسه غلظتهای یونی در دو محیط مورد استفاده (جدول ۵)، نشانگر ازدیاد یونهای کلسیم، منگنز، منیزیم، روی، بر، مس، نیکل، آهن، سولفات و فسفات در محیط DKW نسبت به MS می‌باشد که این موضوع با توجه به نقش حیاتی این یونها در متابولیسم و رشد گیاه، به برتری این محیط منجر می‌گردد.

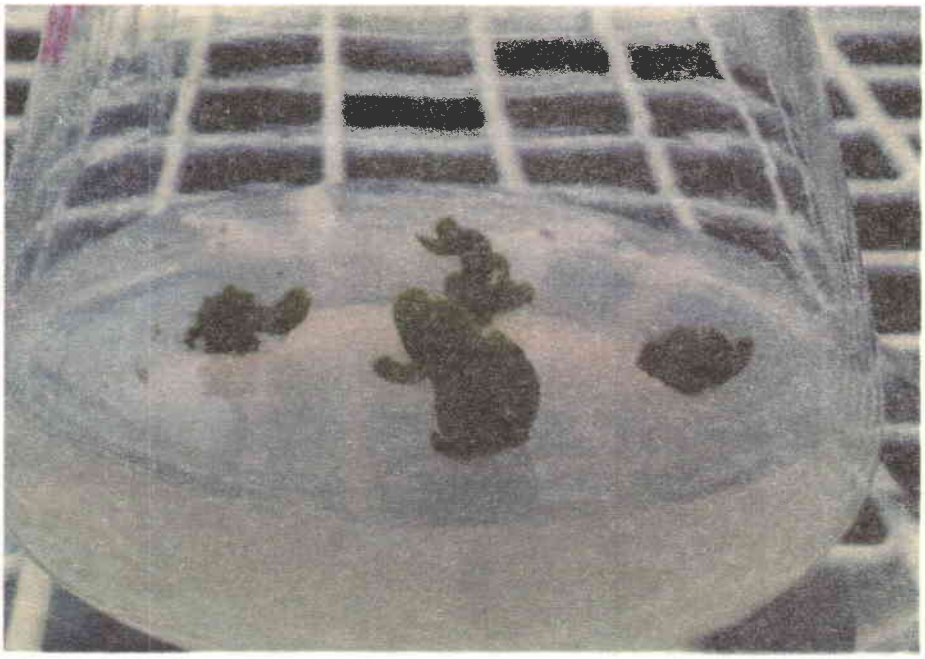
در مورد ریشه‌زایی، در تمام تیمارهای بکار گرفته شده، کاربرد آنتی‌اکسیدانتها، مانند محلول غلیظ اسید اسکوربیک و PVP (پلی‌وینیل پیرولیدون) در موفقیت مراحل سترون‌سازی و استقرار ریزنمونه‌ها، با کاهش ترشحات فنلیک از قاعده آن، مؤثر بوده است.

استفاده از ترکیبهای محرک رشد (مانند عصاره لپه گردو و اوره)، با تأمین اسیدآمینه‌های لازم برای رشد گیاه و آنتی‌اکسیدانتها، با جلوگیری از اکسیداسیون ترکیبهای فنلی در بافتهای گیاه، به تحریک رشد و شروع تمایز دسته‌های آوندی ریشه منجر گردیدند.

بدیهی است این مطالعات، به بررسیهای دقیقتر و کاملتری جهت نیل به هدف نهایی ریشه‌دار شدن گیاه نیازمند هستند.

سپاسگزاری

از خانمهای مهندس، شکوفه شهرزاد و طیبه سهیلا نراقی به دلیل همکاری در اجرای طرح بسیار سپاسگزاریم. از آقای مهندس محسن نصیری به سبب همکاری فکری در اجرای مرحله ریشه‌زایی و از خانم مهندس زهره فرزانه به جهت انجام برش گیریهای میکروتومی این مرحله و نیز از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع که امکان اجرای این طرح را فراهم ساختند بسیار متشکریم.



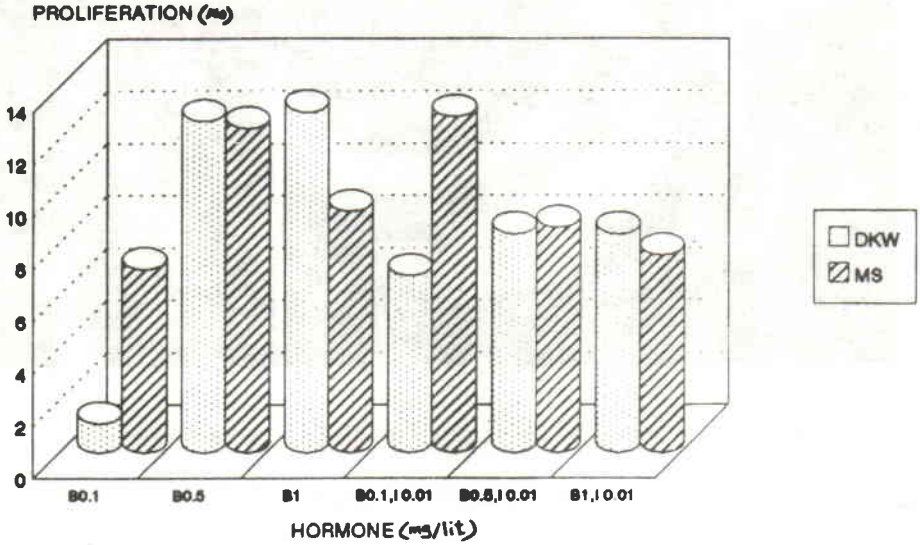
تصویر شمارهٔ ۱: استقرار جوانه‌ها در محیط کشت

تصویر شمارهٔ ۲: نمائی از شاخه‌زایی ریزنمونه‌های گردو

تصویر شمارهٔ ۳. محیط کشت واجد عصارهٔ لپه گردو در تیمار ریشه‌زایی

تصویر شمارهٔ ۴. وصول به کالهای فعال در قاعده شاخه‌های تحت تیمار ریشه‌زایی

تصویر شمارهٔ ۵: نمایی از برشهای میکروتومی کالهای فعال ناشی از تیمار ریشه‌زایی در زیر میکروسکوپ نوری



نمودار شمارهٔ ۱: تأثیر عوامل محیط کشت و هورمون بر شاخه‌زایی

جدول شمارهٔ ۱ - درصد استقرار جوانه‌های فعال در تیمارهای سترون‌سازی مختلف

نوع تیمار	درصد استقرار	درصد آلودگی
A= محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱/۵ دقیقه	۵۰	صفر
B= هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۳ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	صفر	۸۳
C= هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	۳۰	۲۰
D= هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد به مدت ۷ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	۴۷	۵۰
E= هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	۱۸	۶۰
F= هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	۴۶	۷۷
G= محلول پرکلرین ۲ درصد به مدت ۲۰ ثانیه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	صفر	۱۰۰
H= محلول پرکلرین ۲ درصد به مدت ۱۰ ثانیه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	صفر	۸۰
I= محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۷ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	صفر	۹۰

جدول شمارهٔ ۲- درصد استقرار جوانه‌ها در تیمارهای مختلف تحت تأثیر محل برداشت جوانه از پایه

نوع تیمار	درصد استقرار جوانه‌های بالای تاج	درصد استقرار جوانه‌های پایین تاج
A= محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه	۴۰	۹۰
B= هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد به مدت ۶ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	۳۸	۷۰
D= هیپوکلریت سدیم ۰/۷۵ درصد به مدت ۴ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	۵۵	۸۰
C= هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه و کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۴۰ ثانیه	۵۸	۷۰

جدول شمارهٔ ۳- نتایج جدول تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی و رشد طولی تحت تأثیر عوامل محیط کشت (A) و هورمون (B)

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS	
		شاخه‌زایی	رشد طولی شاخه
A	۱	۸۰/۷^{ns}	۰/۸۹۷^{ns}
B	۵	۴۲/۱۰۱^{ns}	۰/۱۴۹^{ns}
A*B	۵	۸۲/۴۹۸*	۰/۳۷۲^{ns}

غیرمعنی‌دار =ns معنی‌دار در سطح ۵ درصد = *

جدول شمارهٔ ۴- مقایسه میانگینهای شاخه‌زایی و رشد طولی نمونه‌ها در برابر تیمارهای مختلف هورمونی در دو محیط کشت مورد استفاده

غلظت هورمونی (میلیگرم در لیتر)	محیط DKW		غلظت هورمونی (میلیگرم در لیتر)	محیط MS	
	شاخه‌زایی (No)	رشد طولی (cm)		شاخه‌زایی (No)	رشد طولی (cm)
BA۰/۱	۱/۱۱b	۱/۶۸a	BA۰/۱	۷ab	۱/۳۵a
BA۰/۵	۱۲/۶۶a	۱/۸a	BA۰/۵	۱۲/۳۸ab	۱/۸۲a
BA۱	۱۳/۰۲a	۱/۸۸a	BA۱	۹/۲۱ab	۱/۵۴a
BA۰/۱ IBA۰/۰۱	۶/۷۵ab	۱/۵۸a	BA۰/۱ IBA۰/۰۱	۱۲/۸۳a	۱/۷۷a
BA۰/۵ IBA۰/۰۱	۸/۳۵ab	۱/۷۲a	BA ۰/۵ IBA۰/۰۱	۸/۶ab	۱/۵۱a
BA۱ IBA۰/۰۱	۸/۳۵ab	۱/۷۲a	BA ۱ IBA۰/۰۱	۷/۳۵ab	۱/۳۵a

مقایسه میانگینها از روش دانکن ۵٪=a انجام شده درجه آزادی خطا: ۲۴ LSD رشد طولی: ۰/۷۹ LSD شاخه‌زایی: ۹/۸۷

حروف مشابه در هر ستون، بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

جدول شمارهٔ ۵- مقایسه یونهای موجود در دو محیط کشت

یونهای موجود در محیط کشت	میزان (میلی‌مول) در DKW	میزان (میلی‌مول) در MS
$NH4^{+}$	۱۷/۷	۲۰/۶۱
K^{+}	۲۰	۲۰/۰۴
Mg^{++}	۳	۱/۵
Mn^{2+}	۰/۱۹۸	۰/۱۳۲
Zn^{2+}	۰/۰۵۷	۰/۰۲۹
Cu^{2+}	۰/۰۰۱	۰/۱
Co^{2+}	-	۰/۱۰۵
Na^{+}	۰/۳	۰/۲۲۴
Fe^{2+}	۰/۱۲۲	۰/۱
Ca^{2+}	۹/۳	۲/۹۹
$Po43^{-}$	۲	۱/۲۵
$So4^{2-}$	۱۲/۳	۱/۷۶
Cl^{-}	۲	۶
I^{-}	-	۰/۰۰۰۰۰۵
$No3^{-}$	۳۴/۴	۳۹/۴
$Bo3^{-}$	۰/۰۷۸	۰/۱
$Moo4^{-2}$	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۰۰۰۱۰۳
Ni^{+2}	۰/۰۰۰۰۱۹	-

منابع مورد استفاده

آئینه‌چی، یعقوب (۱۳۶۵). مفردات پزشکی و گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران.

ثابتی، حبیب‌اله (۱۳۴۴). جنگلها، درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات دانشگاه تهران.

طباطبائی، محمد (۱۳۶۳) صنایع روکش و نماسازی. انتشارات وزارت صنایع.

لطفیان، حسن (۱۳۶۶) گیاهشناسی، جنس گردو. بررسی و مقایسه بعضی ارقام گردوی موجود در منطقه کرج. سمینار تحقیقات و برنامه‌ریزی باغبانی کشور، ارومیه.

نصیری، محسن (۱۳۷۱) تکثیر غیرجنسی گردوی ایرانی، پایان‌نامهٔ فوق لیسانس.

وحدتی، کوروش (۱۳۷۳) بررسی جنبه‌های مختلف تکثیر غیرجنسی گردوی ایرانی در شرایط درون‌شیشه‌ای و مزرعه، پایان‌نامهٔ فوق لیسانس.

Bonga, J.M. 1991. Rooting of shoots. In: Bonga and Aderkadd. In vitro culture of trees. Cluwer Academic (pub.): 107-114.

Chalupa, V. 1981. Clonal propagation of broad leaved forest trees in vitro. 12: 255-271.

Cornu, D. 1991. Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant cell tissue and organ culture. 9: 59-62.

Cornu, D. and J. Allemand, 1992. Root development of in vitro hybrid Walnut micropropagation in a vermiculite-containing Gelrite medium: 355-342.

Cumminus, J.N. and W.C. Ashby, 1969. Aseptic culture of *Juglans nigra* stem tissues. For. Sci 15: 102-103.

Driver, J.A. and H. Kuniyuki, 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut root stocks (*J. hindsii x J. regia*). Hort.

Science 19: 507-509.

Allemand, J. 1990. Naphtoquinones and flavonoles associated with walnut rejuvenation processes. Plant Physiology. 11: 147-150.

Leslie. C.A. and G.H. Mc Granahan. 1992. Micropropagation of walnut. Bajaj. YPS. Biotechnology in Agricultural Forestry. vol 18: 279-281.

Mc Granahan. G.H. 1987. Tissue culture of Juglans. In: Bonga and Durzan (edt). Cell and Tissue culture in Forestry vol 3. Martinus. Nijhoff (Pub.): 261-271.

Rodriguez, R. 1982. Callus initiation and root formation from in vitro culture of walnut cotyledons. Hort. Science. 17: 195-196.

Skooge. F and T. Mourashige, 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 473-479

Micropropagation of mature *Juglans regia* by tissue culture

Emam, M., Izadpanah, M.
Research Institute of Forests and Rangelands
Genetic and Physiology Dept.
P.O. Box: 13185-116, Tehran, Iran.

Abstract

In order to investigate walnut *(Julgans regia)*, shoot tips and axillary buds of elite adult trees were collected from natural stands and used as explants.

Suitable method of sterilization was found. Sterilized explants cultured on media with different concentration at different growth regulators. DKW medium containing BA=1mg/lit was the best medium for shoot proliferation. GA3, promoted latheral bud growth and shoot proliferation. MS and DKW medium containing 0.25 mg/lit GA3 and 0.5 mg/lit BA, were the best composition for shoot proliferation.

Shoots cultured on hormone free DKW medium before rooting treatments, were longer and more vigorous. There was no rooted shoot although many different treatments like decreasing macroelements and sucrose concentrates, using of activated charcole and adding different vitamins and aminoacids to the medium have been investigated.