تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۷ شماره ۳، پاییز۹۳

اثر نوع محیط کشت و نوع سیتوکینین برمراحل اولیه ریز ازدیادی گردو (*Juglans regia* L.)، ژنوتیپ منتخب ۳۰۵

شادی محمدی نژاد[۱]، منصور غلامی[۲]* و محمود اثنی عشری

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا

۲*- **نویسنده مسوول:** استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا (mgholami@basu.ac.ir)

۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳

چکیده

در این پژوهش اثر دو نوع محیط کشت DKW (Driverand Kuniyuki Walnut Medium) و WPM(Woody Plant Medium) و سه غلظت صفر، ۰/۵ و ۱ میکرو مولار از هورمون بنزیل آدنین(BA) بر میزان استقرار ریز نمونه‌های قلمه تک‌گره از گردوی ژنوتیپ منتخب ۳۰۵ بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. همچنین اثر دو نوع هورمون سیتوکینینی بنزیل‌آدنین و کینتین(Kn) در سه غلظت٤/٤، ٦/٦ و ۸/۸ میکرو مولار همراه با دو غلظت از هورمون ایندول بوتیریک اسید(IBA) ۰/۰۵ و ۰/۱میکرو مولار بر پرآوری ریز نمونه‌های استقرار یافته در محیط انتخاب شده از آزمایش مرحله‌ی قبل، بصورت طرح کاملاً تصادفی نا متعادل مورد بررسی قرار گرفت. تمامی داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسه میانگین آن‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن تجزیه و تحلیل شدند. هدف از آزمایش استقرار، تعیین مؤثرترین محیط کشت و بهترین ریز نمونه-ها برای انتقال به مرحله بعدی بود. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد از نظر شاخص تعداد گره و برگ، محیط کشت DKW مؤثر تر از WPM بوده است. بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ میکرو مولار بنزیل‌آدنین نیز در هیچیک از شاخص‌های اندازه گیری شده تفاوت معنی داری مشاهده نشد، اما اختلاف آنها نسبت به تیمار شاهد معنی دار بود. با تعیین مؤثرترین محیط کشت در مرحله‌ی استقرار، از آن برای مرحله بعدی استفاده شد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در مرحله پرآوری نشان داد که بنزیل‌آدنین در غلظت ۸/۸ میکرو مولار دارای بیشترین شاخص‌های رشد بود و با غلظت ٤/٤ میکرو مولار اختلاف معنی داری داشت. نتایج کلی این آزمایش نشان می‌دهد که بنزیل‌آدنین مؤثرتر از کینتین عمل نموده است و در تمامی تیمارها با افزایش غلظت سیتوکینین-ها صفات مورد بررسی افزایش یافت.

کلید واژه ها: گردوی ایرانی، استقرار، پرآوری، ژنوتیپ، محیط کشت

مقدمه

گیاهانی نظیر گردوی ایرانی (*Juglan regia* L.) که روش‌های معمول ازدیاد مانند قلمه و پیوند، برای آنها کارایی لازم را ندارند، از طریق روش‌های ریز ازدیادی شانس بیشتری برای تکثیر دارند. عوامل زیادی نظیر شرایط فیزیولوژیک گیاه مادری، نوع ریز نمونه و حتی موقعیت آن روی گیاه مادری بر موفقیت در ریز ازدیادی اثر دارند. از مهمترین مراحل این روش مرحله استقرار و رشد ریز نمونه ها است. محققان از محیط‌های کشت متفاوتی برای کشت ریز نمونه‌های گردو استفاده کرده‌اند که درصد موفقیت آنها بسته به نوع محیط کشت متفاوت بوده است. اولین گزارشات ریز ازدیادی گردوی ایرانی مربوط به اوایل دهه ۱۹۸۰ است (چالوپا[۱]، ۱۹۸۱؛

1- Chalupa

رودریگز[1]، ۱۹۸۲؛ سامرز و همکاران[2]، ۱۹۸۲؛ کارسو[3]، ۱۹۸۳). درایور و کنیوکی[4](۱۹۸۴)، محیط کشتهای متفاوتی را برای کشت ریز نمونه های تک گره‌ای از دانهال گردوی پارادوکس (Paradox) بررسی کرده و گزارش دادند که محیط‌های WPM (لوید و مک کاون[5]، ۱۹۸۱) نسبت به محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ[6]، ۱۹۶۲؛ پیغام زاده و کاظمی‌تبار، ۱۳۸۹) و محیط کشت چنگ[7] بهتر هستند. ناواتل و بوراین[8](۲۰۰۱) گزارش دادند که بیشترین قطر و همگنی در شاخه های گردوی ایرانی در محیط DKW بود. در مقایسه‌ای که بین محیط‌های کشت مختلف برای ریز ازدیادی گردوی ایرانی (*J. regia*) توسط سعادت و هنرتی[9](۲۰۰۲) صورت گرفته مشخص شد زمانیکه از ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل[10] بعنوان عامل ژل کننده استفاده شود،DKW یک محیط مناسب است. بوسلا و میکلر[11](۲۰۰۸)، در بررسی محیط‌های کشت بهینه برای *J. nigra* دریافتند که MS، DKW در مقایسه با WPM و ½DKW عارضه شیشه‌ای شدن کمتری ایجاد نمودند. مقایسه غلظت‌های یونی در دو محیط MS وDKW نشان دهنده برتری مقادیر یون‌های کلسیم، منیزیم، منگنز، روی، بُر، مس، نیکل، آهن، سولفات و فسفات در محیط DKW است که این موضوع با توجه به نقش حیاتی این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه، موجب برتری این محیط گردیده است (امام، ۱۳۸۳). هیل سادهولت و همکاران [12](۱۹۸۶) دریافتند که اگرچه رشد محورهای جنینی روی محیط WPM سریعتر بوده است. در حالیکه پرآوری شاخه و رشد طولی آن‌ها نهایتاً در محیط DKW بهتر صورت می گیرد.

تاکنون توافقی روی نوع سیتوکینین مناسب برای پرآوری شاخساره وجود نداشته و معمولاً بنزیل-آدنین(BA) برای کشت‌های تکثیری استفاده شده است (سامرز و همکاران، ۱۹۸۲؛ کارسو،۱۹۸۳؛ هیل و همکاران[13]، ۱۹۸۴ و استفان[14]، ۱۹۸۹؛ پیغام زاده و کاظمی تبار[15]، ۲۰۱۱). اما در تحقیقات اخیر از تیدیازرون که یک سیتوکینین مصنوعی استبرای پرآوری شاخه استفاده می‌شود. اغلب محققان از غلظت‌های ۱ میلی گرم در لیتر (۴/۴ میکرو مولار) بنزیل‌آدنین همراه با مقادیر کمی از ایندول بوتیریک اسید (IBA) برای ریز ازدیادی و پرآوری گردوی ایرانی استفاده کرده‌اند (رودریگز، ۱۹۸۲؛ ریولا و همکاران[16]، ۱۹۸۹؛ پنوئلا وهمکاران[17]، ۱۹۸۸؛ اسکالتسویانس و همکاران[18]، ۱۹۹۷؛ ریوسلئال و همکاران[19]، ۲۰۰۷؛ پیغام زاده و کاظمی تبار، ۲۰۱۰؛ امیری و قرائتی[20]، ۲۰۱۲). بوسلا و میکلر (۲۰۰۸)، در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه (*J. nigra*) دریافتند که بنزیل‌آدنین، تیدیازورون (TDZ) و زآتین (ZEA) هر سه بر بازایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها فقط در بنزیل‌آدنین (۱۲/۵-۵ میکرو مولار) وزآتین (۲۵-۵ میکرومولار) مشاهده شد. در این تحقیق به برتری زآتین نسبت به بنزیل‌آدنین برای افزایش طول شاخساره اشاره شده اما تأثیر مثبت در غلظت‌های پایین دیده شده در حالیکه در غلظت‌های بالا باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن گردیده است. پژوهش حاضر به منظور معرفی بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی در ریز ازدیادی گردوی رقم ۳۰۵ انجام گرفت.

1- Rodriguez
2- Somers *et al.*
3- Caruso
4- Driver & Kuniuky
5- Lioyd & McCown
6- Murashige & Skoog
7- Cheng
8- Navatel & Bourrain
9- Saadat & Hennerty
10- Phytagel
11- Bosela & Michler
12- Heile-Sudholt *et al.*
13- Heile *et al.*
14- Stefan
15- Kazemitabar
16- Revilla *et al.*
17- Penuela *et al.*
18- Scaltsoyiannes *et al.*
19- Riosleal *et.al.*
20- Amiri & Gharati

مواد و روش‌ها

ریز نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش قلمه‌های تک گره ژنوتیپ ۳۰۵ بودند. این ژنوتیپ توسط مرکز تحقیقات گردوی تویسرکان به عنوان ژنوتیپ برتر معرفی و پلاک کوبی شده و جهت تهیه پیوندک برای تکثیر استفاده می‌شود. نمونه‌های مورد نیاز در اوایل خرداد ماه از قسمت میانی شاخه‌های سال جاری که حدود ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متر رشد کرده بودند تهیه شد. ریز نمونه‌ها در دو محیط کشت پایه DKW و WPM همراه با مقادیر مختلف هورمون‌های بنزیل‌آدنین وکینتین (Kn)، همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و ۱ گرم در لیتر پلی وینیل پیرولیدین[1] (PVP) کشت و ارزیابی شدند. نمونه‌های شاخه پس از انتقال به آزمایشگاه، ۳۰ دقیقه زیر آب جاری همراه با محلول ۲ در هزار سفید کننده (وایتکس) قرار گرفتند. ابتدا شاخه‌ها به طول ۵-۳ سانتی‌متر بریده شده، سپس ۱/۵ دقیقه با الکل ۷۰٪ شستشو شده و بعد با آب مقطر آبکشی شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به زیر هود برای ۱۵ دقیقه در هیپو کلریت سدیم ۱/۵٪ قرار داده شدند و بعد از آن هم ۳ بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند.

در مرحله استقرار دو محیط کشت DKW و WPM حاوی هورمون بنزیل‌آدنین در دو سطح ۰/۵ و ۱ میکرو مولار همراه با ۰/۱ میکرومولار ایندول بوتیریک اسید ارزیابی شدند. پس از ضدعفونی به منظور کنترل میزان ترشح ترکیبات فنولی، نمونه‌ها به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در محلول حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پلی وینیل پیرولیدین قرار داده شدند و سپس کشت شدند. همچنین نمونه‌های کشت شده برای کنترل ترشح ترکیبات فنولی ۷-۵ روز در شرایط تاریکی قرار گرفتند. با توجه به مقدار ترشح مواد فنولی در فاصله زمانی ۱۰-۲ روز در محیط مشابه واکشت می‌شدند. شاخص های رشد شامل طول شاخه بر حسب سانتی متر، تعداد گره و تعداد برگ پس از گذشت یک ماه و قبل از انتقال به محیط کشت مرحله‌ی پرآوری ارزیابی شدند.

در مرحله پرآوری پس از مشخص شدن بهترین محیط کشت اثر سه فاکتور شامل هورمون ایندول-بوتیریک اسید در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۱ میکرو مولار، بنزیل‌آدنین و کینتین هر یک در سه سطح ۴/۴۴، ۶/۶۶ و ۸/۸۸ میکرو مولاربر تعداد شاخه در ریز نمونه، طول شاخه اصلی بر حسب سانتی‌متر، تعداد گره در شاخه اصلی و تعداد برگچه به عنوان شاخص‌های رشد بررسی شدند. در این مرحله شاخص‌های رشد پس از گذشت دو ماه اندازه گیری شدند. شرایط اتاقک رشد (دمای ۱±۲۴، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) در همه‌ی آزمایشات ثابت و بدون تغییر بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایش‌های مربوط به مرحله استقرار بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، و آزمایشات مربوط به مرحله‌ی پرآوری بصورت طرح کاملاً تصادفی نامتعادل بودند. تمامی داده‌ها از نظر نرمال بودن تست شده و تجزیه وتحلیل آن‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. داده-های مربوط به صفت قهوه‌ای شدن بصورت مشاهده‌ای (کیفی) و غیر پارامتریک تعیین شدند. برای این کار نمونه های مورد نظر براساس شدت رنگ ظاهری مرتب شدند ودر پنج گروه قرار داده شدند بطوریکه به صورت عدد دهی از یک تا پنج، به ترتیب کمترین تا بیشترین میزان قهوه‌ای شدن را نشان می‌دادند، با استفاده از آزمون کروسکال والیس با توزیع کای-اسکور که با نرم‌افزار SAS قابل اجراست بررسی شدند.

نتایج و بحث

مرحله استقرار ریز نمونه

جدول تجزیه واریانس اثر محیط کشت و غلظت هورمون بنزیل آدنین بر میزان استقرار ریز نمونه های ژنوتیپ ۳۰۵ نشان می دهد که در شاخص طول شاخه

1 - Polyvinylpyrrolidone

تنها اثر غلظت هورمون در سطح ۱٪ معنی دار شده است. اما در شاخص تعداد گره و برگ هر دو اثر ساده محیط کشت و غلظت هورمون در سطح ۱٪ معنی دار شده اند (جدول ۱). مقایسه میانگین داده ها نشان دادکمترین طول شاخه (۰/۶۱ سانتیمتر) مربوط به تیمار بدون بنزیل آدنین بوده است و بالاترین طول شاخه (۱ سانتیمتر) در حضور ۱ میکرو مولار بنزیل آدنین تولید شده است که با غلظت ۰/۵ میکرو مولار آن تفاوت معنی داری نداشت. تیمار با هر دو غلظت مورد اشاره، از نظر طول شاخه با تیمار شاهد تفاوت معنی دار داشتند. در شاخص تعداد گره و برگ محیط DKW مؤثرتر از WPM عمل کرده و تفاوت بین آنها معنی دار بود. سعادت و هنرتی (۲۰۰۲)، گزارش کرده¬اند که تفاوت معنی داری در وزن تر کالوس و شاخه و طول شاخه اصلی بین نمونه¬های کشت شده در محیط DKW و MS وجود ندارد اما هر دوی آنها نسبت به WPM بطور معنی داری بهتر هستند. درایور کنیوکی (۱۹۸۴)، گزارش کردند که محیط DKW برای ریز ازدیادی گردو ی پارادوکس بهتر از محیط WPM است.

همچنین هیل سادهولت و همکاران (۱۹۸۶)، دریافتند که شاخه‌های جانبی گردوی سیاه در محیط کشتDKW بطور معنی داری بزرگتر بوده و سطح برگ بیشتری داشتند. با توجه به یافته‌های این محققان به نظر می‌رسد که بطور کلی محیط کشتDKWنسبت به WPM تأثیر بهتری بر شاخص‌های رشد گونه‌های مختلف گردو دارد. در پژوهش حاضر نیز نتایج مشابهی بدست آمد.

بوسلا و میکلر (۲۰۰۸) برای یافتن بهترین محیط کشت برای ریز ازدیادی گردوی سیاه چهار نوع محیط کشت را بررسی کردند و مشاهده کردند که در محیط WPM و ½DKW ۶۰-۱۰۰٪ عارضه شیشه‌ای شدن وجود دارد در حالی که در محیط DKW و MS این مقدار ۴۰٪-۱۰ است. در تحقیق حاضر پس از استفاده دو محیط کشت WPM و DKW این عارضه مشاهده نشد. همچنین کمترین تعداد گره و برگ به ترتیب (۱/۵ و ۲/۳) مربوط به تیمار بدون بنزیل‌آدنین و بالاترین تعداد گره و برگ به ترتیب (۳/۵ و ۴/۵ عدد) مربوط به غلظت ۱ میکرو مولار بنزیل‌آدنین بوده است که تنها با غلظت شاهد تفاوت معنی داری داشت (جدول ۲).

داده‌های مربوط به صفت قهوه‌ای شدن مشاهده‌ای و غیر پارامتریک بودند و از آزمون کروسکال والیس با توزیع کای‌اسکور برای بررسی آن‌ها استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که هر سه عامل روی این صفت بی-تأثیر و نتایج غیر معنی دار بوده است (جدول ۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر محیط کشت و غلظت هورمون بر استقرار ریز نمونه‌های ژنوتیپ ۳۰۵

		میانگین مربعات		
منابع تغییر	درجه آزادی	طول شاخه	تعداد گره	تعداد برگ
محیط کشت	۱	۰/۰۲۲ns	۲/۷*	۲/۷*
غلظت	۲	۰/۲۴**	۵/۵**	۵/۵**
محیط * غلظت	۲	۰/۰۱۳ns	۰/۱ns	۰/۱ns
خطا	۱۲	۰/۰۱	۰/۶۱	۰/۶۱
ضریب تغییرات		۱۳/۹۵	۲۶/۵۴	۱۹/۸۱

ns * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ۵٪ و ۱٪

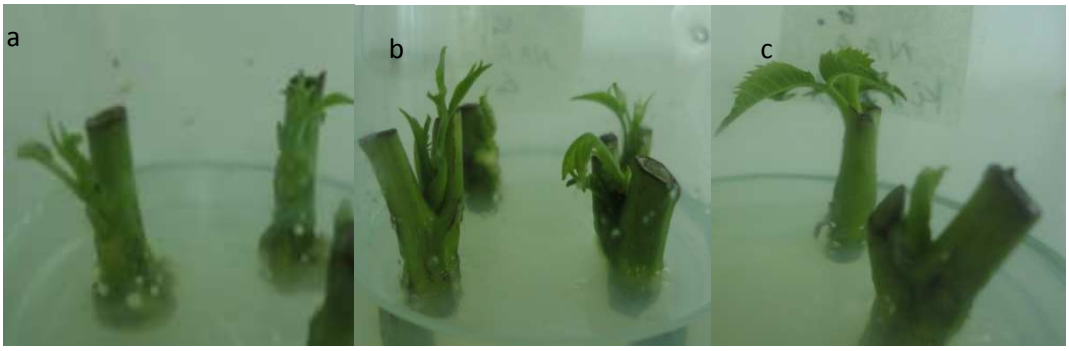
جدول۲- مقایسه میانگین اثر محیط کشت و غلظت هورمون بر استقرار ریز نمونه‌ها

تیمار	طول شاخه برحسب (سانتی متر)	تعداد گره	تعداد برگ
M_1	۰/۸۵[a]	۳/۰۵[a]	۴/۱۲[a]
M_2	۰/۷۷[a]	۲/۵[b]	۳/۵[b]
D_1	۰/۶۱[b]	۱/۵[b]	۲/۳[b]
D_2	۰/۹[a]	۲/۸[a]	۳/۸[a]
D_3	۱[a]	۳/۵[a]	۴/۵[a]
M_1D_1	۰/۶[bc]	۱/۳۳[c]	۲/۶[c]
M_1D_2	۰/۹[ab]	۳[ab]	۴[a]
M_1D_3	۱/۰۳[a]	۳/۶۶[a]	۴/۶۶[a]
M_2D_1	۰/۵۳[c]	۱/۶۶[bc]	۲/۶[c]
M_2D_2	۰/۸[ab]	۲/۶۶[abc]	۳/۶[b]
M_2D_3	۰/۹۶[a]	۳/۳[a]	۴/۳۳[ab]

M1 و M2 به ترتیب محیط کشت DKW و WPM

D_1، D_2 و D_3 به ترتیب غلظت ۰، ۰/۵، ۱ میکرو مولار هورمون BA

* حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ باآزمون دانکن می‌باشد



شکل ۱- جوانه زنی ریز نمونه‌های تک گره ژنوتیپ ۳۰۵ در مرحله‌ی استقرار a ، b و c به ترتیب ۱، ۰/۵ میکرو مولار BA و شاهد

جدول۳- نتایج توزیع کای- اسکور اثر محیط کشت و غلظت هورمون بر میزان قهوه‌ای شدن در ژنوتیپ ۳۰۵ در مرحله‌ی استقرار

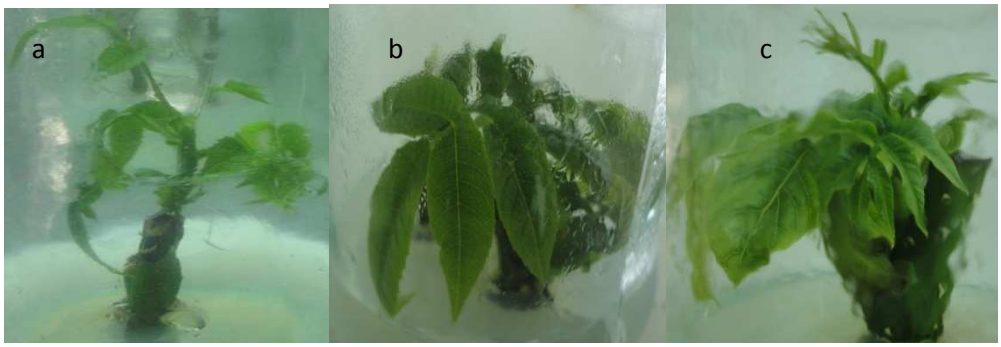
Abc	Std	Mean Score
۱	۱۰/۴۲	۸/۴
۰/۵	۱۰/۴۲	۱۱/۲۱

* این آزمون غیر معنی دار است

مرحله پرآوری ریز نمونه

نتایج جدول تجزیه واریانس این مرحله نشان داد که تیمارهای هورمونی بر تمامی شاخص‌های اندازه گیری شده در سطح ۱٪ تأثیر معنی داری داشت (جدول ۴).

در این ژنوتیپ بالاترین تعداد شاخه (۵/۳۳ عدد) و طول شاخه اصلی (۴/۳۳ سانتی متر) در تیمار ۸/۸۸ میکرو مولار بنزیل‌آدنین همراه با ۰/۰۵ میکرو مولار ایندول-بوتیریک اسیدبوده که با تیمارهای حاوی ۶/۶۶ و ۸/۸۸ میکرو مولار از هر دو سیتوکینین اختلاف معنی داری نداشت اما با غلظت ۴/۴۴ از آن‌ها دارای اختلاف معنی دار بود. تیمارهای شاهد دارای کمترین تعداد شاخه (۱/۳۳ عدد) و طول شاخه (۱/۰۳ سانتی متر) بودند. همچنین بیشترین تعداد گره (۵/۳۳ عدد) نیز در تیمار ۸/۸۸ میکرو مولار بنزیل‌آدنین همراه با ۰/۰۵ میکرو مولار ایندول‌بوتیریک اسید بود که با سایر تیمارهای همین غلظت اختلاف معنی دار نداشت. در تمام تیمارها به جز بنزیل‌آدنین حاوی ۰/۱ میکرو مولار ایندول-بوتیریک اسید اختلاف معنی داری بین غلظت ۸/۸۸ با ۶/۶۶ و ۴/۴۴ میکرومولار از هر دو سیتوکینین وجود داشت. کمترین تعداد گره (۱/۳۳ عدد) در تیمار شاهد حاوی ۰/۱ میکرو مولار ایندول‌بوتیریک اسید مشاهده شد. در صفت تعداد برگچه بالاترین تعداد (۲۷/۶۶ عدد) در تیمار ۸/۸۸ میکرو مولار بنزیل‌آدنین همراه با ۰/۰۵ میکرو مولار ایندول‌بوتیریک اسید بود که با غلظت ۶/۶۶ میکرو مولار هر دو نوع سیتوکینین فاقد اختلاف معنی دار و با ۴/۴۴ میکرومولار دارای اختلاف معنی دار بود (شکل ۲). کمترین تعداد برگچه (۵/۳۳ عدد) نیز در تیمار شاهد وجود داشت (جدول۵).



شکل ۲- مرحله پرآوری ژنوتیپ ۳۰۵، شش هفته پس از انتقال به محیط پرآوری
تعداد برگ به ترتیب در محیط حاوی ۸/۸ میکرو مولار BA (a)، ٦/٦ میکرومولار BA (b) و ٤/٤ میکرومولار BA (c)

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر هورمون و غلظت آن بر پرآوری شاخه در ریز نمونه‌های قلمه تک گره ژنوتیپ ۳۰۵ در محیط کشت DKW

		میانگین مربعات			
منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد گره	تعداد برگچه
تیمار	۱۳	۵/۰۵**	۲/۸۸**	۴/۰۱**	۱۱۳/۵۶**
خطا	۲۷	۰/۶۸	۰/۱۳	۰/۴۴	۱۰/۸۵
ضریب تغییرات		۲۳/۷۳	۱۱/۱۱	۱۸/۸۵	۱۸/۶۸

ns غیر معنی دار

* و **به ترتیب معنی دار در سطح ۵٪ و ۱٪

جدول۵- اثر هورمون و غلظت آن بر پرآوری شاخه در ریز نمونه‌های قلمه تک گره ژنوتیپ ۳۰۵ در محیط کشت DKW

تیمار	تعداد شاخه در ریز نمونه	طول شاخه اصلی برحسب سانتی متر	تعداد گره در شاخه اصلی	تعداد برگچه
I_1B_1	۳^{cd}	۲/۹۶^{c}	۳/۳۳^{cd}	۱۶/۳۳^{cde}
I_1B_2	۴/۶۶^{ab}	۳/۶۳^{abc}	۳/۶۶^{cd}	۲۱^{bcd}
I_1B_3	۵/۳۳^{a}	۴/۰۳^{ab}	۵/۳۳^{a}	۲۷/۶۶^{a}
I_1K_1	۲/۳۳^{de}	۳/۵۳^{bc}	۳/۳۳^{cd}	۱۴^{e}
I_1K_2	۴^{abc}	۳/۸۳^{ab}	۳/۶۶^{cd}	۱۷/۳۳^{bcde}
I_1K_3	۴^{abc}	۳/۹^{ab}	۵^{ab}	۲۲/۳۳^{abc}
I_2B_1	۳/۳۳^{bcd}	۳/۴۶^{bc}	۳^{cd}	۱۷/۳۳^{bcde}
I_2B_2	۴/۵^{abc}	۳/۵۵^{bc}	۴^{bc}	۱۸/۵^{bcde}
I_2B_3	۴/۶۶^{ab}	۳/۹۳^{ab}	۴^{bc}	۲۲/۳۳^{abc}
I_2K_1	۲^{de}	۳/۶^{bc}	۲/۶۶^{de}	۱۵/۳۳^{de}
I_2K_2	۴/۳۳^{abc}	۳/۷^{ab}	۳/۶۶^{cd}	۲۰/۳۳^{bcde}
I_2K_3	۴/۳۳^{abc}	۴/۳۳^{a}	۵^{ab}	۲۳^{ab}
I_1	۱/۶۶^{e}	۱/۲۶^{d}	۱/۶۶^{ef}	۶/۳۳^{f}
I_2	۱/۳۳^{e}	۱/۰۳^{d}	۱/۳۳^{f}	۵/۳۳^{f}

I_1 و I_2 به ترتیب IBA در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۱ میکرو مولار

B و K به ترتیب BA و Kn

B_3 ,B_2 ,B_1, به ترتیب BA و K_3 K_2, K_1, کینیتین در سه سطح ۴/۴۴، ۶/۶۶ و ۸/۸۸ میکرو مولار

* حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشد

نتایج کلی این آزمایش نشان داد بنزیل‌آدنین مؤثرتر ازکینتین عمل می‌کند و در تمامی تیمارها با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها صفات مورد بررسی افزایش یافت. اگرچه برخی از آن‌ها فاقد اختلاف معنی دار بودند.

بوسلا و میکلر(۲۰۰۸) با مقایسه انواع سیتوکینین‌ها شامل بنزیل‌آدنین، زآتین و تیدیازورون دریافتند که همه آن‌ها بر باز زایی شاخه مؤثرند اما بنزیل‌آدنین در غلظت ۱۲/۵-۵ میکرومولار و زآتین در غلظت ۲۵-۵ میکرو مولار برای طویل شدن شاخه بسیار مناسب هستند. در این پژوهش نیز بهترین نتایج در حضور ۸/۸ میکرو مولار بنزیل‌آدنین بدست آمده که با حداقل غلظت مورد استفاده یعنی ۴/۴ میکرومولار بنزیل‌آدنین، دارای اختلاف معنی دار است.

سعادت و هنرتی (۲۰۰۲) در بررسی غلظت‌های مؤثر هورمون بنزیل‌آدنین (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بر پرآوری گردوی ایرانی گزارش کردند که غلظت‌های ۰/۸ و ۱ میلی گرم در لیتر (معادل ۳/۵۵-۴/۴۴ میکرومولار) مناسب هستند که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر در برخی موارد مطابقت ندارد. همچنین آنان دریافتند که ریز شاخه‌های تولید شده در محیط حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک اسیدنسبت به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از آن، طویل‌تر و با مورفولوژی بهتر بخصوص از نظر شکل برگ ها هستند. در پژوهش حاضر نیز بالاترین میزان تمام شاخص‌ها در ۰/۰۵ میکرومولار ایندول‌بوتیریک اسید حاصل شد. اگرچه فاقد اختلاف معنی دار با ۰/۱ میکرومولار آن بودند. همچنین برخی محققین (درایور و کنیوکی، ۱۹۸۴؛ مک گراناهان و لیزلی[1]، ۱۹۶۲ و ریولا و همکاران، ۱۹۸۹) اظهار داشتند غلظت ۰/۶-۰/۴ میلی گرم در لیتر بنزیل-

1- McGranahan & Leslie

آدنین همراه با ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک اسید برای طویل شدن برگ ریز شاخه‌های گردوی ایرانی بسیار مناسب است و غلظت‌های کمتر بنزیل‌آدنین باعث کاهش کیفیت شاخه‌های تولید شده می‌شود. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از نوع محیط کشت، نوع ماده گیاهی مورد استفاده و حتی نوع ژنوتیپ باشد. پنوئلا و همکاران (۱۹۸۸) گزارش دادند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین برای پرآوری شاخه گردوی ایرانی در محیط MS کافی است وغلظت‌های بالاتر منجر به تولید کالوس بیشتر و غلظت‌های پایین‌تر پاسخی در ریزنمونه‌ها ایجاد نمی‌کند. اما ریولا و همکاران (۱۹۸۹)، گزارش کردند که تولید کالوس و همچنین شیشه‌ای شدن در غلظت‌های پائین تر از ۸/۸۷ میکرومولار ایجاد نمی‌شود، که در تحقیق حاضر نیز ما موردی از شیشه‌ای شدن مشاهده نکردیم و لذا با مشاهدات ما هم مطابقت داشت.

اسکالتسویانس و همکاران (۱۹۹۷)، اظهار کردند که برای افزایش طول و تعداد شاخه‌های گردوی ایرانی بهترین ترکیب هورمونی ۴/۴ میکرومولار بنزیل‌آدنین همراه با ۰/۰۵ میکرومولار ایندول‌بوتیریک اسید است همچنین گروسل و بکسوس[1](۱۹۹۰)، گزارش کردند بهترین باززایی شاخه در محیط DKW حاوی ۳/۵۵-۴/۴ میکرومولار بنزیل‌آدنین است. ممکن است این محققان تنها غلظت‌های تا حد ۴/۴۴ میکرو مولار را بررسی کرده باشند. این در حالی است که گروسل و همکاران (۱۹۸۷)، گزارش دادند، غلظت‌های ۴/۴ و ۸/۹ میکرومولار بنزیل‌آدنین برای کشت ریز نمونه‌های گردوی ایرانی مناسب هستند. در تحقیقی دیگر گزارش شده که در محیط DKW حاوی ۸/۹ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین(BAP) طول شاخه‌ها افزایش می‌یابد (پیغام زاده[2]، ۲۰۰۸). در پژوهش حاضر بهترین نتایج در حضور ۸/۸ میکرومولار بنزیل‌آدنین حاصل شد که در اکثر موارد با همین مقدار از هورمون کینتین تفاوت معنی داری نداشت. همچنین بین غلظت‌های ۶/۶ و ۸/۸ هم تفاوت معنی داری ملاحظه نگردید.

1- Gruselle & Boxus
2- Payghamzadeh

منابع

۱. امام، م. ۱۳۸۳. بررسی تکثیر غیر جنسی گردوی بالغ ایرانی (*Juglans regia* L.) با کشت سرشاخه‌های انتهایی. پژوهش و سازندگی، ۶۳: ۱۰-۱۵.

۲. پیغام زاده، ک. و کاظمی تبار، س.ک. ۱۳۸۹. مروری برتحقیقات کشت بافت گردو (*Juglans sp*. L.) درجهان. مجله الکترونیک کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، ۳ (۱) :۲۵-۴۳.

3. Amiri, M.E., and Gharati S. 2012. Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. Journal of Medicinal Plants Research, 6(8): 1482-1485.

4. 4.Bosela, M.J., and Michler, C.H. 2008. Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth *in vitro*: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In vitro* cellular and developmental biology-plant, 44:316–329.

5. Caruso, J.L. 1983. *In vitro* axillary shoot formation and rooting in black walnut mature embryos. In: Guries, R.P. (ed.), Proc. 3rd North Central Tree Improvement Conf, Wooster, Ohio. North Central Tree Improvement Association, Madison, Wisconsin, 144–149.

6. Chalupa, V. 1981. Clonal propagation of broad-leaved forest trees in vitro. Comm. Inst. For Cech, 12: 255–271.

7. Driver, J.A., and Kuniyuki, AH. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut (*Juglans hindsii* × *Juglans regia*) rootstock. Hort Science. 19: 507-509.

8. Gruselle, R., Badia, N., and Boxus, P. 1987. Walnut micro propagation: first results. Acta Horticulturae, 212: 511-516.

9. Gruselle, R., and Boxus, P. 1990. Walnut micro propagation. Acta Horticulturae. 284: 45–52.

10. Heile, C., Gaffney, G., Preece, J., Meyers, O., and Van Sambeek, J. 1984. *In vitro* culture of *Juglans nigra* seedling shoot tips. Hort Science, 19: 576.

11. Heile-Sudholt, C., Huetteman, C.A., Preece, J.E., Vansambeek, J.W., and Gaffney, G.R. 1986. *In vitro* embryonic axis and seedling shoot tip culture of *Juglans nigra* L. Plant Cell Tissue Organ Culture, 6: 189–197.

12. Lloyd, G., and McCown, B. 1981. Commercially feasible micro propagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proceeding of Plant Propagation Society, 30: 421–427.

13. McGranahan, G.H., and Leslie, C.A. 1988. In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. Hort Science, 23: 220.

14. Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. Physiol Plantarum, 15: 473–497.

15. Navatel, J., and Bourrain, L. 2001. Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication. Acta Horticulturae, 544: 465–471.

16. Payghamzadeh, K. 2008. Somatic embryogenesis from immature cotyledons and meristem culture of walnut (*Juglans regia* L.*)*.The MSc thesis. College of agriculture, Dep. of Plant breeding and Biotechnology, University of Agricultural and Natural Resources of Sari, Iran, pp: 48-77.

17. Payghamzadeh K., and Kazemitabar, SK. 2010. The effects of BAP andIBA and genotypes on in vitro germination of immature walnut embryos. International Journal of Plant Products, 4(4): 309-322.

18. Payghamzadeh, K., and Kazemitabar, S.K. 2011. In vitro propagation of walnut - A review. African Journal of Biotechnology, 10(3): 290-311.

19. Penuela, R., Garavito, C., Sanchez-Tames, R., and Rodrıguez, R. 1988. Mutiple shoot-bud stimulation and rhizogenesis induction of embryogenic and juvenile explants of walnut. Acta Horticulturae, 227: 457-459.

20. Revilla, M.A., Majada, J., and Rodriguez, R. 1989. Walnut *Juglans regia* L. micro propagation. Ann science, 46: 1495-1515.

21. RiosLeal, D., Sanchez-Olate, M., Aviles, F.,Materan, M.E., Uribe, M., Hasbun, R., and Rodriguez, R. 2007 Micro propagation of *Juglans regia* L. In: Jain S.M. Haggman H Protocols for micro propagation of woody trees and fruits. Springer, Dordrecht, pp: 381–390.

22. Rodriguez, R. 1982. Callus initiation and root formation from *in vitro* culture of walnut cotyledons. Horticulture Science, 17: 195–196.

23. Saadat, Y.A., and Hennerty, M.J. 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Scientia Hortticulturae, 95: 251–260.

24. Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panetsos, K., and Moulalis, D. 1997. Effect of genotype on micro propagation of walnut trees *(Juglans regia)*. Silvae Genetica, 46: 326-332.

25. Somers, P.W., Sambeck, J.W., Preece, J.E., Gaffney, G., and Myers, O. 1982. In vitro micro propagation ofblack walnut *(Juglans nigra L.)*. In: Thielges B.A. (ed). Proc. 7th North American Forest Biology Worksh, University of Kentucky, Lexington, pp: 224–230.

26. Stefan, S.J. 1989. Micropropagating black walnut. American Nurseryman, 169: 89–92.