نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، ص. ۷۳-۶۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 27, No. 1, Spring 2013, P. 67-73
ISSN: 2008 - 4730

بررسی اثر ترکیب محیط کشت و نوع سیتوکینین بر استقرار و پرآوری ریز نمونه‌های گردوی Z60

شادی محمدی‌نژاد[۱]- منصور غلامی[۲*]- محمود اثنی عشری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۲۰

چکیده

این تحقیق به منظور مطالعه عوامل مؤثر بر استقرار، رشد و پرآوری شاخساره ریز نمونه‌های گردوی ایرانی، ژنوتیپ Z60 انجام شد. آزمایش استقرار بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، شامل بررسی اثر دو نوع محیط کشت DKW و WPM و غلظت‌های مختلف هورمون BA (۰، ۰/۵ و ۱ میکرو مولار) انجام شد. ریز نمونه‌های تک گره از شاخه‌های جوان ژنوتیپ Z60 در اواخر اردیبهشت ماه تهیه شدند. مقایسه میانگین داده‌های مربوط به دو محیط کشت نشان داد که محیط DKW نسبت به WPM بهتر عمل کرده بود اما تأثیر دو محیط بر شاخص‌های رشد تفاوت معنی داری نداشت. همچنین بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ میکرو مولار BA تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما تفاوت این دو غلظت با محیط فاقد BA معنی‌دار بود. در آزمایش پرآوری، دو هورمون BA و کینیتین در سه غلظت ۴/۴، ۶/۶ و ۸/۸ میکرو مولار در محیط کشت DKW مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های این آزمایش بصورت طرح کاملاً تصادفی نامتعادل تجزیه شد. اثر تیمارهای مختلف هورمونی و غلظت آنها بر شاخص‌های رشد ژنوتیپ Z60 نشان داد که هورمون BA در غلظت ۸/۸ میکرو مولار نسبت به سایر تیمارها مؤثرتر بود، هر چند که بین آنها و سایر تیمارها (۸/۸ میکرو مولار کینیتین و غلظت‌های ۴/۴ و ۶/۶ میکرو مولار هر دو سیتوکینین) در اغلب صفات مورد ارزیابی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: ژنوتیپ، ریز ازدیادی، شاخص رشد، استقرار، پرآوری

مقدمه

گردو گیاهی از خانواده Juglandaceae و جنس *Juglans* است. این جنس دارای ۲۱ گونه می‌باشد و مهمترین گونه از نظر میوه، گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) است. در تکثیر گردوی ایرانی از روش‌هایی مانند قلمه‌گیری استفاده می‌شود که به دلیل ترشح فنول و سخت ریشه‌زایی قلمه‌ها کارایی لازم را ندارد. بنابراین محققان به دنبال روش‌های بهتری نظیر ریز ازدیادی هستند که امروزه در تکثیر گیاهان بویژه گردو اهمیت زیادی یافته است. به کمک این روش می‌توان گیاهان بالغ و یکنواختی را در مدت زمان کوتاهی تولید کرد. عوامل زیادی بر موفقیت کشت بافت مؤثر هستند، از جمله گیاه مادری که باید دارای بهترین شرایط فیزیولوژیک باشد. نوع ریز نمونه که با توجه به هدف ریزازدیادی انتخاب می‌شود و همچنین اندازه، سن و محل قرارگیری ریز نمونه روی گیاه مادری نیز حائز اهمیت می‌باشد (۱۴). نوع محیط کشتی که برای ریزازدیادی استفاده می‌شود نیز در موفقیت کار مؤثر است. درایور و کنیوکی (۳)، محیط کشت‌های متفاوتی را برای کشت ریز نمونه‌های قلمه تک گره از دانهال گردوی پارادوکس بررسی کرده و نشان دادند که محیط کشت‌های WPM (۹) و B_5 (۴) نسبت به محیط کشت MS (۱۲) و محیط کشت چنگ بهتر هستند. اگرچه پرآوری شاخه‌ها در این محیط کشت‌ها صورت گرفت اما واکشت متعدد شاخه‌ها منجر به زوال تدریجی آن‌ها شد و در نهایت محیط کشت DKW (۳) بطور ویژه برای گردو اختصاص یافت. البته موفقیت‌هایی هم با استفاده از محیط کشت MS برای کشت بافت گردوی ایرانی گزارش شده است (۱۵ و ۱۶). در مقایسه‌ای که بین محیط کشت‌های مختلف برای ریز ازدیادی گونه *J. regia* توسط سعادت و هنرتی (۱۹) صورت گرفت مشخص شد زمانی که در محیط کشت DKW از ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل بعنوان عامل ژل کننده استفاده شود محیط مناسبی خواهد بود. بوسلا و میکلر (۱)، در آزمون بررسی محیط کشت‌های بهینه برای گونه *J. nigra* دریافتند که محیط کشت‌های MS، DKW در مقایسه با WPM و DKW عارضه شیشه‌ای شدن کمتری ایجاد می‌کنند. ناواتل و بوراین

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بو علی سینا
(*- نویسنده مسئول: Email: Mgholami@basu.ac.ir)

(۱۳)، گزارش کرده‌اند که بیشترین قطر و همگنی شاخه در محیط کشت DKW حاصل می‌شود. تاکنون توافقی روی نوع سیتوکینین مناسب برای پرآوری شاخساره وجود نداشته و معمولا بنزیل آدنین (BA) برای کشت‌های تکثیری استفاده شده است (۲، ۷، ۲۱ و ۲۲). رودریگز و همکاران (۱۷) در تحقیقی برای پیدا کردن بهترین روش پرآوری شاخه‌های گردوی ایرانی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۲ میلی‌گرم در لیترکینیتین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA را معرفی کردند. سعادت و هنرتی (۱۹) گزارش کردند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در دو محیط کشت MS و DKW برای پرآوری شاخه‌های گردوی ایرانی مناسب است. بوسلا و میکلر (۱)، در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه (*J. nigra*)، دریافتند که بنزیل آدنین (BA)، تیدیازورون (TDZ) و زآتین (ZEA) هر سه بر باززایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها فقط در BA (۱۲/۵–۵ میکرو مولار) و ZEA (۲۵–۵ میکرو مولار) مشاهده شد. اسکالتسویانس و همکاران (۲۰)، بیان کردند که بهترین ترکیب هورمونی برای افزایش طول و تولید شاخه‌های جانبی ۴/۴۴ میکرو مولار BA همراه با ۰/۰۰۵ میکرو مولار IBA است و در این تحقیق غلظت‌های بالاتر از ۴/۴۴ میکرو مولار BA باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن شاخه‌ها گردید اما ریولا و همکاران (۱۶)، عارضه شیشه‌ای شدن را در غلظت-های بالاتر از ۸/۸۷ میکرو مولار مشاهده کرده‌اند.

این پژوهش به منظور معرفی بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی در ریز ازدیادی گردوی رقم Z60 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

ریز نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش قلمه‌های تک گره بودند که در اواخر اردیبهشت ماه از درختان گردوی ژنوتیپ Z60 واقع در کلکسیون مرکز تحقیقات گردوی تویسرکان در استان همدان تهیه شدند. ریز نمونه‌ها در دو محیط کشت پایه DKW و WPM با ترکیب املاح مختلف (۱۴) همراه با مقادیر مختلف هورمون‌های بنزیل آدنین (BA) و کینیتین (Ki)، همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۸ گرم در لیتر آگار و ۱ گرم در لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) کشت شدند.

ضد عفونی

نمونه‌های شاخه ابتدا به مدت۳۰ دقیقه زیر آب جاری همراه با محلول ۲ در هزار پاک کننده (مایع ظرفشویی) قرار گرفتند. سپس شاخه‌ها به طول ۵–۳ سانتی‌متر بریده شده و سپس ۱/۵ دقیقه با الکل ۷۰٪ شستشو شده و پس از آن با آب مقطر آبکشی شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به زیر هود برای ۱۵ دقیقه در هیپو کلریت سدیم ۱/۵ درصد قرار داده شدند و در نهایت ۳ بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند.

مرحله استقرار

به منظور تعیین اثر محیط کشت و غلظت‌های مختلف هورمون BA بر شاخص‌های رشد شامل طول شاخه، تعداد گره و تعداد برگ، از دو محیط کشت DKW و WPM حاوی هورمون BA در دو سطح ۰/۵ و ۱ میکرو مولار همراه با ۰/۱ میکرو مولار IBA، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۸ گرم در لیتر آگار و ۱ گرم در لیتر پلی‌وینیل‌پیرولیدین استفاده شد. قبل از افزودن آگار pH روی ۵/۸ تنظیم شد، سپس محیط در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شد. ریز نمونه‌ها قلمه‌های تک گره از شاخه‌های در حال رشد سال جاری گردوی ژنوتیپ Z60 بودند که پس از ضدعفونی به منظور کنترل ترشح فنول نمونه‌ها به مدت ۳۰–۱۵ دقیقه در محلول حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP قرار گرفته و سپس کشت شدند. همچنین برای کنترل بهتر ترشح فنول ریز نمونه‌های کشت شده به مدت ۷–۵ روز در شرایط تاریکی قرار گرفتند و با توجه به مقدار ترشح فنول، در فاصله زمانی ۱۰–۲ روز، در محیط مشابه واکشت شدند.

مرحله پرآوری

پس از مشخص شدن بهترین محیط کشت در آزمایش قبل، اثر سه فاکتور شامل هورمون IBA در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۱ میکرو مولار، BA و Kin هر یک در سه سطح ۴/۴۴، ۶/۶۶ و ۸/۸۸ میکرومولار بر شاخص‌های مورد ارزیابی بررسی شد. در این مرحله از تعداد برگچه به جای تعداد برگ برای نشان دادن شاخصی از رشد استفاده شد.

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. با توجه به اینکه داده‌های مربوط به صفت میزان قهوه‌ای شدن، مشاهده‌ای و غیر پارامتریک بودند از آزمون کروسکال والیس با توزیع کای–اسکور که با نرم‌افزار SAS قابل اجراست، برای بررسی آن‌ها استفاده شد. سایر داده‌ها از نظر نرمال بودن آزمون شده و تجزیه وتحلیل آن‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

مرحله استقرار

در این آزمایش اثر محیط‌های کشت و غلظت‌های مختلف

هورمون BA بر شاخص‌های رشد اولیه ریز نمونه‌های (قلمه تک گره) ژنوتیپ Z60 بررسی شد. شاخص‌های رشد در این مرحله پس از یک ماه و نیم، هنگام انتقال به محیط پرآوری اندازه‌گیری شدند.

تجزیه واریانس داده‌ها در این آزمایش نشان می‌دهد که تنها اثرغلظت هورمون BA بر شاخص طول شاخه اصلی معنی‌دار شده است. نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد بیشترین طول شاخه (۱/۰۱ سانتی‌متر) در محیط DKW حاوی ۱ میکرو مولار BA و کمترین طول (۰/۵۳ سانتی‌متر) در محیط WPM بدون هورمون BA (شاهد) بوده است. غلظت ۰/۵ و ۱ میکرو مولار BA فاقد اختلاف معنی‌دار با هم بودند، اما تفاوت هر دو با شاهد معنی‌دار بود. در صفت تعداد گره و برگ اثرات محیط کشت و غلظت‌های مختلف هورمون معنی‌دار بودند و بالاترین تعداد گره (۳/۶۶) در محیط DKW حاوی ۱ میکرو مولار BA مشاهده شد. کمترین تعداد گره (۱/۵) مربوط به غلظت شاهد بود. همچنین مشاهده شد که بیشترین تعداد برگ (۴/۶۶) مربوط به محیط DKW حاوی ۱ میکرو مولار BA بوده که نسبت به سایر تیمارها در همین غلظت بیشتر بوده است. اما اختلاف آنها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. همچنین بین تیمارهای حاوی ۰/۵ و ۱ میکرو مولار BA تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد در حالیکه با غلظت شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. کمترین تعداد برگ (۲/۳) مربوط به تیمار فاقد BA بود که با سایر تیمارهای شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند. در این مرحله مشخص شد که DKW محیط کشت مؤثرتری نسبت به WPM است. شکل ۱، جوانه زنی ریز نمونه‌های قلمه تک گره ژنوتیپ Z60 را در مرحله استقرار نشان می‌دهد.

سعادت و هنرتی (۱۹) گزارش دادند که تفاوت معنی‌داری در وزن‌تر کالوس و شاخه و طول شاخه اصلی بین نمونه‌های کشت شده در محیط کشت DKW و MS وجود ندارد اما هر دوی آنها نسبت به WPM بطور معنی‌داری بهتر هستند. درایور و همکاران (۳) گزارش کردند محیط کشت DKW برای ریز ازدیادی گردوی پارادوکس بهتر از محیط WPM است.

شکل ۱- جوانه‌زنی ریز نمونه‌های قلمه تک گره ازگردوی ژنوتیپ Z60 در مرحله‌ی استقرار

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر محیط کشت‌های DKW و WPM و غلظت هورمون BA بر استقرار ریز نمونه‌های قلمه تک گره ژنوتیپ Z60

تیمار	طول شاخه برحسب (cm)	تعداد گره	تعداد برگ
M_1	۰/۸۵ [a]	۳/۰۵۰ [a]	۴/۱۲ [a]
M_2	۰/۷۷ [a]	۲/۵ [b]	۳/۵ [b]
D_1	۰/۵۶ [b]	۱/۵ [b]	۲/۳ [b]
D_2	۰/۹ [a]	۲/۸ [a]	۳/۸ [a]
D_3	۰/۹۸ [a]	۳/۵ [a]	۴/۵ [a]
M_1D_1	۰/۶ [bc]	۱/۳۳ [c]	۲/۶ [c]
M_1D_2	۱ [a]	۳ [ab]	۴ [a]
M_1D_3	۱/۰۱ [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]

M_1 و M2 به ترتیب محیط کشت DKW و WPM

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

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

همچنین هیل سادهولت و همکاران (۸) دریافتند که شاخه‌های جانبی گردوی سیاه در محیط کشت DKW بطور معنی‌داری بزرگتر بوده و سطح برگ بیشتری داشتند. نتایج بدست آمده در پژوهش‌های محققین مذکور با نتایج حاصل از این مرحله مطابقت دارند. بوسلا و میکلر (۱) برای یافتن بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی گردوی سیاه چهار نوع محیط کشت را بررسی کردند و مشاهده کردند که در محیط کشت‌های WPM و DKW مقدار زیادی عارضه شیشه‌ای شدن وجود دارد در حالیکه در محیط کشت DKW و MS این مقدار بسیار کمتر است. در تحقیق حاضر در هیچ یک از موارد استفاده از دو محیط کشت WPM و DKW این عارضه مشاهده نشد. در محیط کشت DKW صفت طول شاخه فاقد اختلاف معنی‌دار با WPM بود اما در دو صفت مورد ارزیابی دیگر یعنی تعداد گره و برگ مؤثرتر از WPM عمل کرده و دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ بود. داده‌های مربوط به صفت میزان قهوه‌ای شدن، مشاهده‌ای و غیر پارامتریک بودند و برای بررسی آنها از آزمون کروسکال والیس با توزیع کای-اسکور استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که اثر محیط کشت و غلظت هورمون روی این صفت بی‌تأثیر و نتایج غیر معنی دار بوده است (جدول ۲).

با مشخص شدن محیط کشت مؤثرتر (DKW) بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها در مرحله‌ی استقرار، تنها از این محیط کشت در آزمایش بعدی استفاده شد. البته بررسی‌های مشابهی موفقیت تکثیر شاخساره روی این محیط را نسبت به سایر محیط‌های کشت تأیید کرده‌اند (۳ و ۱۱).

جدول ۲- نتایج توزیع کای- اسکور اثر محیط کشت و غلظت هورمون بر میزان قهوه‌ای شدن نمونه‌ها در مرحله‌ی استقرار

میزان قهوه‌ای شدن	خطا	میانگین مربعات
۱	۱۰/۴۲	۸/۴
۰/۵	۱۰/۴۲	۱۱/۲۱

* این آزمون غیر معنی‌دار است.

مرحله پرآوری

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمارهای هورمونی بکار رفته در این مرحله بر تمامی شاخص‌های مورد نظر اثر معنی‌داری داشته است. جدول مقایسه میانگین (جدول ۳) داده‌ها در این مرحله نشان می‌دهد که بیشترین تعداد شاخه (۵/۶۶) در غلظت ۸/۸ میکرو مولار BA تولید شده که فاقد اختلاف معنی‌دار با تعداد شاخه در همین غلظت از کینیتین (Kin) می‌باشد. همچنین تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۶/۶ و ۸/۸ میکرو مولار هر دو سیتوکینین وجود نداشت. کمترین تعداد شاخه (۱ عدد) مربوط به تیمارهای شاهد بود که فقط حاوی اکسین بودند.

جدول ۳- اثر نوع هورمون و غلظت آن بر پرآوری شاخه در ریز نمونه‌های قلمه تک گره ژنوتیپ Z60 در محیط کشت DKW

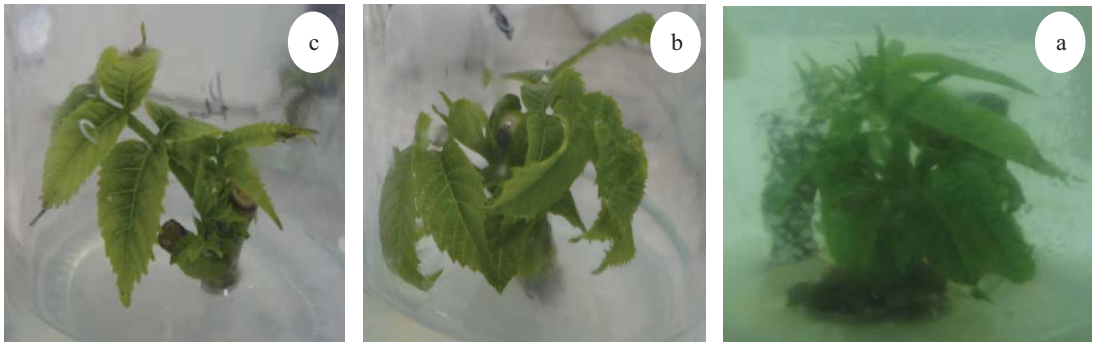
تیمار	تعداد شاخه در ریز نمونه	طول شاخه اصلی (سانتی‌متر)	تعداد گره در شاخه اصلی	تعداد برگچه
$I_1C_1D_1$	۳/۵ bc	۳/۷ ab	۳ bc	۱۳/۳ bc
$I_1C_1D_2$	۴ abc	۳/۸ ab	۳/۳۳ abc	۱۳/۵ bc
$I_1C_1D_3$	۵/۶۶ a	۴ a	۳/۶۶ abc	۱۸/۶۶ ab
$I_1C_2D_1$	۲/۶۶ dc	۳/۰۳ ab	۳ bc	۱۷/۳۳ ab
$I_1C_2D_2$	۴/۵ abc	۳/۴۶ ab	۴ abc	۱۸/۶۶ ab
$I_1C_2D_3$	۵ ab	۳/۸ ab	۴/۶۶ a	۲۲/۵ a
$I_2C_1D_1$	۳/۳۳ bc	۲/۹ b	۲/۶ c	۱۶ bc
$I_2C_1D_2$	۴/۳۳ abc	۳/۵۳ ab	۳/۳۳ abc	۱۹/۳۳ ab
$I_2C_1D_3$	۴/۵ abc	۴ a	۴/۵ ab	۲۰/۵ ab
$I_2C_2D_1$	۲/۶۶ dc	۳/۱ ab	۳ bc	۱۴ bc
$I_2C_2D_2$	۴/۶۶ ab	۳/۷۶ ab	۳/۶۶ abc	۱۹ ab
$I_2C_2D_3$	۴/۵ ab	۳/۸ ab	۴/۵ ab	۲۳/۵ a
I_1	۱ d	۱ c	۱/۳ d	۶/۶ d
I_2	۱ d	۰/۹ c	۱ d	۴ d

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

C_1 و C_2 به ترتیب BA و Kin

D_1، D_2 و D_3 به ترتیب BA و Kin در سه سطح ۴/۴۴، ۶/۶۶ و ۸/۸۸ میکرو مولار

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.



شکل ۲- مرحله پرآوری در ژنوتیپ Z60

تعداد برگچه در محیط کشت DKW به ترتیب حاوی، ۸/۸ میکرو مولار BA (a)، ۶/۶ میکرومولار BA (b) و ۴/۴ میکرومولار BA (c)

اگر چه تعداد شاخه در تیمارهای حاوی ۰/۰۵ میکرو مولار IBA با تیمارهای حاوی ۰/۱ میکرو مولار از IBA تفاوت معنی‌داری نداشت اما تعداد آن در تیمار ۰/۰۵ میکرو مولار بیشتر بود. در نتیجه می‌توان چنین بیان کرد که هر چه مقدار اکسین در محیط کمتر باشد این شاخص افزایش می‌یابد. در شاخص‌های طول شاخه اصلی بالاترین مقدار (۴ سانتی‌متر) مربوط به غلظت ۸/۸ میکرو مولار BA بود که فاقد اختلاف معنی‌دار با اندازه آن‌ها در همین غلظت از کینیتین (Kin) می‌باشد. همچنین تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۴/۴، ۶/۶ و ۸/۸ میکرو مولار BA و Kin از این نظر وجود نداشت. کمترین طول شاخه (۰/۹ سانتی‌متر) مربوط به تیمار شاهد بود. در بین غلظت‌های مختلف هورمون IBA نیز این شاخص تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین تعداد گره (۴/۶۶ عدد) در ۸/۸ میکرو مولار Kin بود که با سایر تیمارها (Kin و BA در حضور ۰/۰۵ و ۰/۱ میکرو مولار IBA) در همین غلظت اختلاف معنی‌دار نداشت. همچنین در این شاخص بین غلظت‌های ۶/۶ و ۸/۸ میکرو مولار اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اما در برخی تیمارها مانند BA در حضور ۰/۱ میکرو مولار IBA و Kin در حضور ۰/۰۵ میکرومولار IBA بین غلظت ۸/۸ و ۴/۴ اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد، مشاهده شد. کمترین تعداد گره (۱ عدد) در تیمار شاهد حاوی ۰/۱ میکرو مولار IBA بود. بیشترین تعداد برگچه (۲۳/۵ عدد) در تیمار ۸/۸ میکرو مولار Kin همراه با ۰/۱ IBA بود که با تیمار۸/۸ میکرو مولار BA همراه با همین مقدار از اکسین اختلاف معنی‌دار نداشت. این تیمار با تیمار ۸/۸ میکرو مولار BA همراه با ۰/۰۵ میکرو مولار IBA دارای اختلاف معنی‌دار بوده است. کمترین تعداد برگچه (۴ عدد) در تیمار شاهد دیده شد (شکل ۲).

در نهایت در این آزمایش مشخص شد که هورمون BA مؤثرتر از Ki عمل می‌کند و در تمامی تیمارها با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها تا ۸/۸۸ میکرو مولار، صفات مورد بررسی افزایش یافت. اگرچه برخی از آنها فاقد اختلاف معنی‌داری با هم بودند. بوسلا و میکلر (۱) با مقایسه انواع سیتوکینین‌ها شامل BA (بنزیل آدنین)، ZEA (زآتین) و TDZ (تیدیازورون) دریافتند که همه آنها بر باززایی شاخه مؤثرند اما BA در غلظت ۱۲/۵-۵ میکرو مولار و ZEA در غلظت ۲۵-۵ میکرو مولار برای طویل شدن شاخه مناسب‌تر هستند. سعادت و هنرتی (۱۹) در بررسی غلظت‌های مؤثر هورمون BA (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 میلی‌گرم در لیتر (معادل ۳/۵۵-۴/۴۴ میکرو مولار) مناسب هستند که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تا حدودی مطابقت دارد چرا که در برخی شاخص‌های مورد بررسی بین غلظت‌های ۴/۴، ۶/۶ و ۸/۸ میکرو مولار BA تفاوت معنی‌دار نبود که معمولاً در این موارد ترجیح داده می‌شود از غلظت‌های پایین‌تر استفاده شود. همچنین این دو محقق دریافتند که ریز شاخه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA نسبت به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر طویل‌تر و با ویژگی‌های ظاهری بهتری هستند. از طرفی در یافته‌های پژوهش حاضر نیز مشخص شد که بین دو غلظت بکار رفته از هورمون IBA، ۰/۰۵ میکرو مولار بر شاخص‌های رشد مؤثرتر عمل کرد. اگرچه تفاوت بین دو غلظت معنی‌دار نبود اما با افزایش غلظت اکسین در محیط، اغلب صفات سیر کاهشی نشان دادند. با توجه به نتایج بدست آمده چنین به نظر می‌رسد که افزایش غلظت اکسین‌ها در محیط‌های شاخه‌زایی و پرآوری مفید نخواهد بود. درایور و کنیوکی (۳)، ریولا و همکاران (۱۶) و مک گراناهان و لیزلی (۱۰) اظهار کردند که ۰/۶-۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای طویل شدن برگ ریز شاخه‌های گردوی ایرانی بسیار مناسب است و غلظت‌های کمتر BA باعث کاهش کیفیت شاخه‌های تولید شده می‌شود. رودریگز (۱۸) بیان کرد کاربرد BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بسیار مناسب است. پنوئلا و همکاران (۱۵) نیز گزارش دادند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA برای پرآوری شاخه گردوی ایرانی در محیط MS کافی است و غلظت‌های بالاتر منجر به تولید کالوس بیشتر و غلظت‌های پایین‌تر

پاسخی در ریزنمونه‌ها ایجاد نمی‌کند. اسکالتسویانس و همکاران (۲۰) اظهار کردند که برای افزایش طول و تعداد شاخه‌های جانبی گردوی ایرانی بهترین ترکیب هورمونی ۴/۴ میکرو مولار BA همراه با ۰/۰۰۵ میکرو مولار IBA است. همچنین گروسل و بوکسوس (۶) گزارش کردند بهترین باززایی شاخه در محیط کشت DKW حاوی ۳/۵۵-۴/۴ میکرو مولار BA است. گروسل و همکاران (۵) دریافتند که غلظت‌های ۴/۴ و ۸/۹ میکرو مولار BA برای کشت ریز نمونه‌های گردوی ایرانی مناسب هستند. پیغام زاده (۱۴) بیان کردند که در محیط کشت DKW ۸/۹ میکرو مولار BAP طول شاخه‌ها افزایش می‌یابد. تفاوت‌های بین غلظت‌های بهینه توسط محققین مختلف می‌تواند ناشی از نوع محیط کشت، نوع ماده گیاهی مورد استفاده و حتی نوع ژنوتیپ بکار برده شده توسط آنها باشد اگر چه برخی از محققین اظهار کردند که در غلظت‌های بالا از BA مشکلاتی مانند عارضه شیشه‌ای شدن و تولید کالوس پیش می‌آید اما در این تحقیق حداکثر غلظت BA مورد استفاده ۸/۸۸ میکرو مولار بود و نظایر این عوارض نیز دیده نشد و احتمال داده می‌شود در صورت کاربرد غلظت‌های بالاتر از این مقدار BA، عارضه شیشه‌ای شدن دیده شود. ریولا و همکاران (۱۶)، نیز گزارش کردند این عارضه در غلظت‌های بالاتر از ۸/۸۷ میکرو مولار ایجاد می‌شود و در غلظت-های پایین تر احتمال بروز آن کم است. با توجه به مشکلات بوجود آمده در تکثیر گردو به روش قلمه‌گیری، اهمیت تکثیر آن به روش ریزازدیادی کاملاً واضح است. اما ریزازدیادی زمانی پاسخگوی تولید انبوه نهال خواهد بود که دستورالعمل معینی برای کاربرد وجود داشته باشد. از طرفی واکنش ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف به یک دستورالعمل معین متفاوت است. این تحقیق برآن است تا بخشی از ابهامات موجود در این زمینه را برطرف سازد.

منابع

1- 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.

2- Caruso J.L. 1983. *In vitro* axillary shoot formation and rooting in black walnut mature embryos. In: Guries RP (Ed) Proc 3rd North Central Tree Improvement Conf, Wooster, Ohio. North Central Tree Improvement Association, Madison, Wisconsin, Pp.144-149.

3- Driver J.A. and KuniyuKi A.H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii*×*Juglans regia* rootstock. Hortscience, 19: 507-509.

4- Gamborg O.L., Miller, R.A. and Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.

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

6- Gruselle R. and Boxus P. 1990. Walnut micropropagation. Acta Horticulturae, 284: 45-52.

7- Heile C., Gaffney G., Preece J., Meyers O. and Van Sambeek J. 1984. In vitro culture of *Juglans nigra* seedling shoot tips. Hortscience, 19: 576-591.

8- 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 and Organ Culture, 6: 189-197.

9- Lloyd G. and Mc-Cown B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by the use of shoot tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators Society, 30: 421-427.

10- McGranahan G.H. and Leslie C.A. 1988. In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. Hortscience, 23: 220-226.

11- McGranahan G.H., Leslie C.A., Uratsu S.L. and Dandekar A.M. 1987. Improved efficiency of the walnut somatic embryo gene transfer system. Plant Cell Reports, 8:512-516.

12- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. Physiololgia Plantarum, 15: 473-497.

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

14- Payghamzadeh K. 2008. Somatic embryogenesis from immature cotyledons and meristemic culture of walnut (*Juglans regia* L.), The MSc thesis. College of agriculture, Deprtment of Plant Breeding and Biotechnology, University of Agricultural and Natural Resources of Sari, Iran, Pp. 48-77.

15- 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 Horticlturae, 227: 457-459.

16- Revilla M.A., Majada J. and Rodriguez R. 1989. Walnut *Juglans regia* L. micropropagation. Ann Science, 46: 1495-1515.

17- Rodriguez R., Lopez C., Diaz-Sala C. and Berros B. 1993. *Simultaneous* shoot-bud development on walnut tissues of different ages: macromorphological and histological analyses. Acta Horticlturae, 311: 141-152.

18- Rodriguez R., Revilla A., Albuerne M. and Perez C. 1989. Walnut (*Juglans spp.*), In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 5. Trees II. Springer, Berlin. Pp. 99-126.
19- Saadat Y.A. and Hennerty M.J. 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Scientia Horticlturae. 95:251-260.
20- Scaltsoyiannes A., Tsoulpha P., Panetsos K. and Moulalis D. 1997. Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia*). Silvae Genetica. 46: 326-332.
21- Somers P.W., Sambeck J.W., Preece J.E., Gaffney G. and Myers O. 1982. In vitro micropropagation of black walnut (*Juglans nigra* L.). Thielges BA (Ed.) Proc 7th North American Forest BiologyWorksh, University of Kentucky, Lexington. Pp. 224-230.
22- Stefan S. J. 1989. Micropropagating black walnut. American Nursery Magazine. 169: 89-92.