نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۳۳۷-۳۲۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 327-337
ISSN: 2008 - 4730

تاثیرلیگنوسولفونات برریشه‌زایی درون شیشه‌ای گردو

مریم افلاکی جلالی - عبداله حاتم زاده [۲*] - حسن بهرامی سیرمندی [۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۱

چکیده

ریزازدیادی گردو برای تکثیر انبوه در مدت زمان کم کاربرد دارد. با این حال سخت ریشه‌زابودن یکی از عمده‌ترین مشکلات برای تکثیر رویشی گردو به روش ریزازدیادی است. در این مطالعه تاثیر لیگنوسولفونات[۴] به‌منظور بهبود ریشه‌زایی گردو در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا ریزنمونه‌ها روی محیط کشت درایور-کونیکی[۵] استقرار یافتند. به‌منظور القای ریشه در ریزنمونه‌ها از دو آزمایش مختلف استفاده شد. در آزمایش اول ریزنمونه‌ها ابتدا به محیط القاء ریشه‌دهی حاوی چهار غلظت ایندول بوتیریک اسید (۳، ۵، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند سپس هر یک از تیمارها در تاریکی به‌مدت ۳، ۵ و ۷ روز قرار داده شدند. تیمارهای مربوط به غلظت‌های ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسیدو ۷ روز تاریکی بالاترین درصد ریشه‌زایی را داشتند. در آزمایش بعدی از ترکیب سه سطح لیگنوسولفونات (۱، ۲ و ۳ گرم در لیتر) و دو غلظت ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید استفاده شد. هر یک ازتیمارها در تاریکی به‌مدت ۷ روز قرارداده شدند. پس ازالقای ریشه، ریزشاخه‌ها به محیط نمو ریشه منتقل شدند که شامل یک چهارم غلظت محیط درایور-کونیکی و ورمی‌کولیت بود. با افزایش میزان لیگنوسولفونات میزان ریشه‌زایی کاهش می‌یابد ولی با این حال بالاترین میزان ریشه‌زایی درکل تیمارهای بررسی شده در تیمار ۱ گرم در لیتر لیگنوسولفونات به‌دست آمد. این مطالعه اولین گزارش از ریشه‌زایی یک رقم گردو به نام هارتلی[۶] با استفاده از سینرژیست لیگنوسولفونات می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ایندول بوتیریک اسید، ریشه‌زایی، سینرژیست، کشت بافت، گردو

مقدمه

گردوی معمولی (*Juglansregia*L.) گیاهی از خانواده *Juglandaseae* می‌باشد که دارای هفت جنس و حدود ۶۰ گونه درخت خزان‌پذیر است. جنس *Juglans* دارای ۲۱ گونه است که همگی دارای میوه خوراکی می‌باشند (۲۱). بهترین گونه این جنس *J.regia* (گردوی ایرانی) می‌باشد. گیاهان این خانواده به‌صورت درختی، خزان‌دار، یک‌پایه، دارای برگ‌های مرکب شانه‌ای با برگچه‌های وسیع و پوشیده از کرک‌های منشعب می‌باشد. گردو در مناطق معتدل به‌خوبی رشد می‌کند و آب و هوای خیلی سرد و خشک را نمی‌پسندد (۲۱).

گردو با وجود آنکه بومی ایران است و کاشت، داشت، برداشت و مراحل پس از برداشت آن بسیار مشابه پسته است، نقشی در ارزآوری کشور ندارد. مهم‌ترین علت این موضوع این است که تکثیر درخت گردو در کشور ما تاکنون به‌طریق جنسی (به‌وسیله بذر) انجام شده و این سبب شده است که تنوع وسیعی در خصوصیات محصول و درختان گردو به‌وجود آید (۱). وجود چنین تنوع ژنتیکی اگرچه از نظر بهنژدای بسیار باارزش است ولی باتوجه به اهمیت یکنواختی محصول برای صادر کردن میوه‌ها به بازار جهانی، سامان بخشیدن به تولید و صادرات این محصول تنها از طریق شناسایی ژنوتیپ‌های برتر کشور و تکثیر آن‌ها به‌طریق رویشی به‌منظور احداث باغ‌های یکنواخت از ارقام مشخص میسر می‌شود. مرسوم‌ترین روشی که در دنیا به‌طور وسیعی برای تکثیر درخت گردو مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش پیوند زدن است. با این وجود، گیرایی پیوند گردو نسبت به سایر درختان میوه کم است (۱).

تکنیکی که امروزه برای تکثیر انبوه درختان گردو به‌کار می‌رود، استفاده از فنون کشت‌بافت است.کشت‌بافت گردو در سال‌های اخیر

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: Email: hatamzadeh@guilan.ac.ir)
۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته تولیدات گیاهی، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

4- Lignosulfunate
5- (Driver- Kuniyuki) DKW
6- Hartley

به‌طور چشمگیری پیشرفت کرده است (۲۱). مشخص شده است که گیاهان تولید شده در شرایط درشیشه از طریق کشت قطعات ساقه‌ای در مقایسه با گیاهانی که از طریق تکنیک‌های سنتی پیوند تولید شده‌اند زودتر تولید میوه می‌کنند، علاوه بر این سیستم ریشه‌زایی قویتر و ناسازگاری بین پایه و پیوندک را نشان نمی‌دهند (۱۴ و ۲۰). با این حال سخت ریشه‌زابودن گردو یکی از عمده‌ترین مشکلات برای تکثیر رویشی گردو به روش ریزازدیادی است (۶). محققان مختلفی تکنیک‌های کشت بافت برای تکثیر گردوی ایرانی را مطالعه کردند. اولین تلاش‌ها برای تکثیر گردو با استفاده از محیط کشتی انجام شد که برای گیاهان چوبی دیگر مناسب است. درایور-کونیکی (۸) با استفاده از محیط کشت Cheng (۴)، Murashige and Skoog (MS) (۲۳)، B5 (۱۰) و محیط کشت گیاهان چوبی (WPM) (۱۹) دریافتن که محیط کشت به‌طور تدریجی تخریب می‌شود. برای حل این مشکل، آنها محیط کشت جدیدی به نام DKW ساختند (۲۱) که به‌طور ویژه برای رشد هیبریدهای پارادوکس بهینه سازی شد. با اینکه این محیط کشت برای هیبریدهای پارادوکس تهیه شد ولی ثابت شده که برای واریته‌های مختلف گردو مناسب است (۸). اگرچه به‌طور معمول آگار به عنوان عامل جامد کننده برای بیشتر محیط‌های کشت به کار برده می‌شود، ژلرایت به عنوان عامل جامد کننده برای محیط کشت DKW مورد استفاده قرار گرفت. لسلی و مک گراناهان (۱۸) گزارش دادندکه استفاده از آگار با محیط DKW اثر مخربی بر روی گردو دارد. باربا‌س و همکاران (۲) گزارش کردند که عامل ژله‌ای کننده بر روی رشد ساقه‌های گردو در شرایط درون شیشه‌ای اثر دارد. ژلرایت افزایش طول ساقه و تولید جوانه را القا می‌کند در حالیکه آگار رشد را مهار کرده و منجر به ایجاد برگ‌های کاملاً پهن می‌شود ولی تشکیل برگ‌های جدید را محدود می‌کند. بر روی محیط کشت حاوی ژلرایت، برگ‌ها کوچک‌تر و روشن‌تر بودند و برگ‌های جدید به‌طور مرتب تشکیل شدند (۲). رویلا و همکاران (۲۶) گزارش کردند که بهترین ترکیب از تنظیم کننده‌های رشد برای ریزازدیادی *Juglansregia*L.، ۶- بنزیل آمینو پورین[1] با غلظت ۱ گرم در لیتر و ایندول ۳-بوتیریک اسید[2] با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. غلظت‌های بالاتر ۶- بنزیل آمینو پورین تغییرات مورفولوژیکی ساقه‌ها را به‌وجود می‌آورد و در نهایت این تغییرات منجر به شیشه‌ای شدن می‌شود.

حفاظت اکسین در برابر سیستم اکسین- اکسیداز می‌تواندبه ریشه‌زایی کمک بزرگی بکند (۶). ازجمله ترکیباتی که می‌توانند نقش سینرژیستی (هم‌افزایی) بااکسین داشته باشند احتمالا توانایی حفاظت اکسین در برابر آنزیم‌ها را خواهند داشت (۲۵). لیگنوسولفونات محصول جانبی صنایع کاغذ است. نشان داده شده که با افزودن لیگنوسولفونات خام حاصل از صنایع کاغذ به محیط کشت هم رشد رویشی و هم رشد زایشی در چندین گیاه (درخت راج، صنوبر، جنسینگ) افزایش یافته است (۱۲). هم‌چنین لیگنوسولفونات به میزان زیادی نمو ریشه را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به‌نظر می‌رسد به‌عنوان محافظ اکسین در مقابل اکسیدازها عمل می‌کند. یک فرضیهٔ محتمل این است که لیگنوسولفونات ممکن است عمل اکسین طبیعی یا سنتزی را با افزودن به حساسیت اندام نسبت به اکسین افزایش دهد (۳۳). این گروه از دانشمندان فرض کردند که لیگنوسولفونات‌ها مانند محصولات حاصل از تجزیهٔ دیوارهٔ سلولی، به عنوان محرک عمل می‌کنند. این‌چنین فرضیاتی باید با مولکول کوچک استخراج شده و خالص‌سازی شده از لیگنوسولفونات خام تست شوند. و در این آزمایش‌ها لازم است فرضیهٔ تلی‌شوا و همکاران (۳۰) بررسی شود. این فرضیه بیان می‌کند لیگنوسولفونات‌ها به میزان زیادی توسط تأمین سیلیکون، در رشد و نمو گیاه شرکت دارند. به‌علت توانایی بالای تشکیل کمپلکس توسط لیگنوسولفونات، ممکن است طول دورهٔ فعالیت سیلیکون را افزایش دهند. باتوجه به یافته‌های یاماشیتا (۳۴)، یک فعالیت محتمل برای لیگنوسولفونات ممکن است آسان‌تر کردن انتقال اسکلت کربن/ انرژی یا ترکیبات ماکرو مواد غذایی به داخل سلول‌های گیاهی یا آسان‌تر کردن انتقال مواد از طریق تغییر در ساختار خاک باشد. امروزه اثر مفید لیگنوسولفونات‌ها بر رشد و نمو گیاهان شناخته شده و به عنوان مادهٔ موثر می‌توانند به محیط کشت اضافه شوند.

بر این اساس در این بررسی برای اولین بار اثر این سینرژیست اکسین بر بهبود ریشه‌زایی ریزنمونه‌های رقم هارتلی گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه‌ای بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب ریزنمونه و ضدعفونی

در این آزمایش از رقم هارتلی استفاده شد. ریزنمونه‌ها از کلکسیون درختان مادری موسسه ثبت گواهی و نهال بذر وزارت جهاد کشاورزی در کرج تهیه شدند. در اواخر فروردین ماه ساقه‌های ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متری را از درختان مادری انتخاب و سپس آن‌ها را به قطعات گره‌ای ۳ تا ۵ سانتی‌متری تقسیم کردیم. قطعات جدا شده به‌مدت ۱ ساعت در زیر شیر آب شستشو شدند و بعد از آن قطعات ریزنمونه را به‌مدت یک دقیقه درالکل ۷۰ درصد وسپس به مدت ۱۰ دقیقه در وایتکس ۱۰درصد قرار داده شدند. پس از ضدعفونی سطحی در زیر هود لامینار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان هر قطعه سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شده و در نهایت وارد محیط کشت پایه شدند.

1- BA
2- IBA

در تمامی آزمایش‌ها برای تهیه ریزنمونه، شاخه‌ها از ۲ سانتی‌متری بالای ریزقلمه‌های رقم هارتلی همراه با ۴ یا ۵ برگ بالایی قطع شدند تا به این ترتیب ریزنمونه‌هایی یکسان به‌دست آید. ریزنمونه‌های مورد آزمایش تقریباً اندازه یکسانی حدود ۰/۲±۴ سانتی‌متری داشتند.

مرحله استقرار

محیط کشت افزونگری شاخساره‌ها

افزونگری این ریزنمونه‌ها با استفاده از محیط کشت درایور- کونیکی که دارای ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل[1]، ۱ میلی‌گرم در لیتر بوتیریک اسید، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود، انجام شد. گیاهچه‌ها هر ۲۵ روز مورد واکشت قرار می‌گرفتند. pH محیط قبل از اضافه کردن فیتاژل و اتوکلاو کردن روی ۵/۶ تنظیم شد. ظروف شیشه‌ای قابل اتوکلاو با ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری و قطر ۶ سانتی‌متری برای افزون گری شاخه‌ها استفاده شدند و در هر ظرف ۴ شاخه کشت شد. این شاخه‌ها در اتاقک کشت و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. نور با استفاده از ۵ لامپ مهتابی که در ۱۵ سانتی‌متری بالای ظروف کشت قرار داشتند تأمین شد. شدت نور در بالای ظروف کشت ۵۵۰۰ لوکس بود. کلون‌های حاصل از این ارقام در تمام مراحل انجام آزمایش‌ها به‌عنوان ریزنمونه به‌کار رفتند.

محیط کشت القای ریشه

به‌منظور القای ریشه در ریزنمونه‌ها از سه آزمایش مختلف استفاده شد. در آزمایش اول ریزنمونه‌ها به محیط القاء که شامل چهار غلظت ایندول بوتیریک اسید (۳، ۵، ۷ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) بود منتقل شدند و هر یکازتیمارهادر تاریکی به‌مدت ۳، ۵ و ۷ روز در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در آزمایش دوم دو تیمار از آزمایش اول که بالاترین درصد ریشه‌زایی را داشتند، تعیین شد که این تیمارها مربوط به غلظت‌های ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید بودند. در آزمایش بعدی از ترکیب سه مقدار لیگنوسولفونات (۱، ۲ و ۳ گرم در لیتر) و دو مقدار ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید استفاده شد. شاخساره‌ها بعد از اعمال تیمارها به‌مدت ۷ روز در تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

نمو ریشه

پس از القای ریشه، ریز شاخه‌ها به محیط نمو ریشه منتقل شدند. محیط نمو ریشه شامل یک چهارم غلظت محیط درایور-کونیکی و ورمی‌کولیت بود. این ریزشاخه‌ها به‌مدت ۲۱ روز در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت تاریکی در اتاقک کشت قرار گرفتند.

در روز بیست و یکم طول ریشه با دقت اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری طول متوسط ریشه پس از اندازه‌گیری طول ریشه‌های تولیدی در ریز ساقه‌ها، نتیجه به تعداد ریشه‌ها تقسیم و میانگین آن‌ها برحسب سانتی‌متر مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز داده‌ها

تجزیه داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با ۲ تکرار انجام شد. برای آزمایش اول، فاکتورها شامل غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید و زمان‌های تاریکی و برای آزمایش دوم فاکتورها شامل غلظت‌های لیگنوسولفونات و ایندول بوتیریک اسید بودند. در هر تکرار ۱۰ شاخه در شیشه‌های کشت با حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بودند، قرار داده‌شد. تجزیه واریانس به روش GLM (General Linear Model) و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد توسط نرم‌افزار SAS انجام شد.

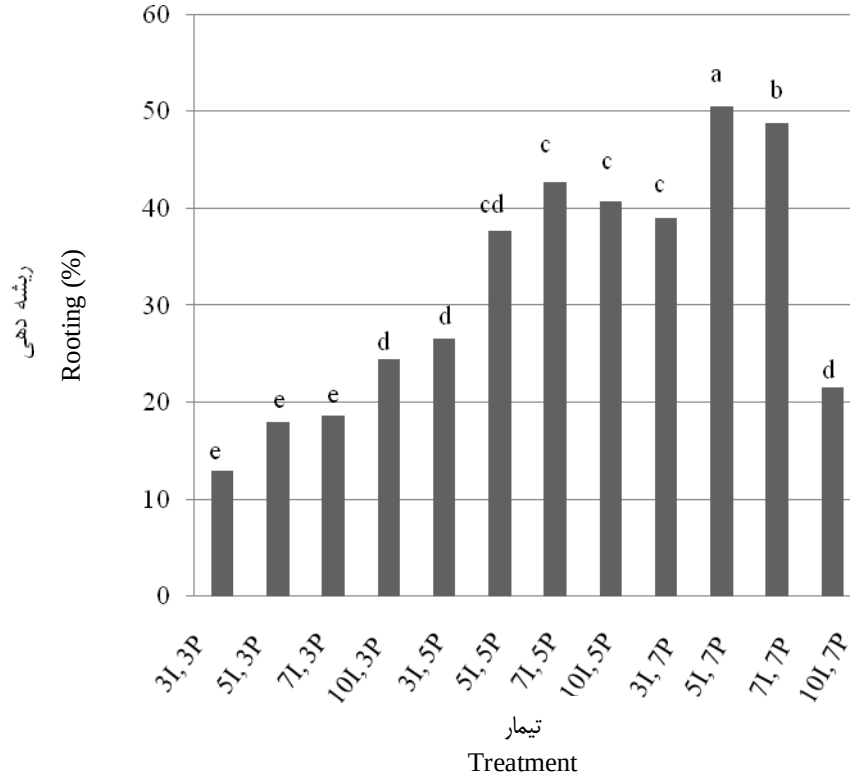
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر مصرف ایندول بوتیریک اسید، دوره تاریکی و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری برای دو صفت درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در هر دو رقم نشان داد (جدول تجزیه واریانس ذکر نشده است) با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل دو فاکتور، مقایسه میانگین‌ها در حالت ترکیب دو فاکتور بررسی شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین درصد ریشه‌زایی در ترکیب‌های تیماری ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۷ روز تاریکی به‌دست آمد که به‌ترتیب برای رقم هارتلی ۴۸/۸ درصد و ۵۰/۵٪ درصد بود (شکل ۱).

با افزایش غلظت ایندول بوتیریک اسید و طول دوره القاء، ریشه‌زایی افزایش یافت. با این حال ریشه‌زایی ریزساقه‌ها تا یک غلظت معین افزایش و بعد از آن شروع به کاهش می‌کند (جدول ۱).

بیشترین درصد ریشه‌زایی مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۷ روز تاریکی و ۷ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۷ روز تاریکی بود، که به‌ترتیب ۴۸/۸٪ و ۵۰/۵٪ بود (شکل ۲). برای صفت طول ریشه نیز بیشترین طول ریشه در تیمارهای ۵ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر غلظت ایندول بوتیریک اسید و دوره تاریکی ۷ روز بدست آمد که به‌ترتیب برای رقم هارتلی ۱۲/۰۴ سانتی‌متر و ۱۱/۱۸ سانتی‌متر بود که با نتایج صفت قبلی مطابقت داشت (جدول ۱).

1-Phytagel



شکل ۱- برهمکنش ایندول بوتیریک اسید (میلی‌گرم در لیتر(I)) × دوره تاریکی (روز) (D) بر درصد ریشه‌زایی گردو رقم هارتلی. حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.

Figure 1-Interaction effect of IBA concentrations (mg/l) × induction period (days) on rooting percentage of Walnut cv. 'Hartley' Based on Duncan's multiple range test, similar letters in each column are not significance at 1%level of probability 1%. IBA (mg/l)= I, Number of Days= D.

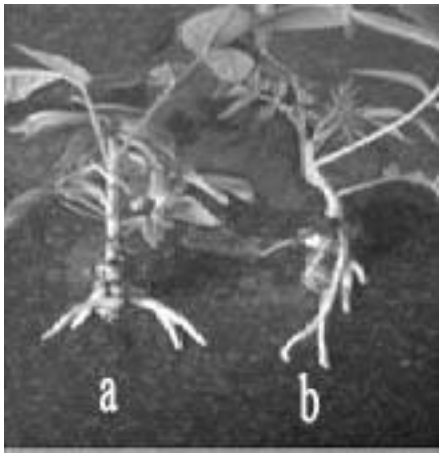
جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید و مدت زمان القاء برطول ریشه‌ریزساقه‌های گردو رقم'هارتلی'

Table 1- Effect of different concentrations of IBA and induction period root length of walnut cv. 'Hartley'

غلظت ایندول بوتیریک اسید IBA (mg/l)	مدت زمان القاء Induction Period (Number of Days)	طول ریشه Root Length (cm)
3	3	2.01e
5	3	3.14e
7	3	4.20e
10	3	8.10d
3	5	8.00d
5	5	9.00d
7	5	10.00c
10	5	10.09c
3	7	9.12d
5	7	12.04a
7	7	11.18b
10	7	7.8d

حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.

Similar letters in each column are not significant at 1% of probability level based on Duncan's multipile range test.



شکل ۲- ریزساقه‌های ریشه‌دارشده گدو رقم 'هارتلی' مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسیدو ۷ روزتاریکی (a) و ۷ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۷ روز تاریکی (b)

Figure 2- Rooted microshoots walnut cv. 'Hartley' in 5 mgl^{-1} IBA and 7 days darkness(a), and Rooted microshoots in 7 mgl^{-1} IBA and 7 days darkness (b).

در مجموع، بیشترین درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در تیمار های ۵ و ۷ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۷ روزتاریکی بدست آمد (شکل ۲)، بنابراین برای آزمایشات بعدی از دو غلظت ۵ و ۷ میلی گرم ایندول بوتیریک اسید استفاده شد. در این آزمایش درصد ریشه‌زایی گردوی کشت بافتی حدود ۴۰-۵۰ درصد به‌دست آمد که نسبت به نتایج آزمایشات وحدتی و همکاران (۳۲) که ریشه‌زایی ۳۷/۱-۵۸/۵ و نتایج به‌دست آمده توسط جی-آلمند و همکاران (۱۶) ریشه‌زایی حدود ۱۵-۵۰ درصد را به‌دست آوردند مقدار قابل قبول و مناسبی بود.

بررسی‌های انجام شده در رابطه با ریشه‌زایی گردو نشان داد که بالاترین درصد ریزشاخسارهای ریشه‌دارشده با ایندول بوتیریک اسید در مقایسه با سایر اکسین‌ها به‌دست آمد (۲۹). به‌طور مشابه، پی و همکاران (۲۴) نشان دادند که غلظت ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید برای ریشه‌زایی گردو ایده‌آل است. غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسیدسبب کاهش ریشه‌زایی و افزایش کالوس انتهایی، برگ‌ریزی و پژمردگی می‌شود و غلظت‌های پایین‌تر از ۳ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید عدم ریشه‌زایی را درپی دارد. قرار دادن تیمارهای ریشه‌زایی در شرایط تاریکی به‌علت تخریب هورمون اکسین در مقابل نور می‌باشد و همینطور زمان القاء به غلظت اکسین به‌کار رفته بستگی دارد. هرچه غلظت اکسین کمتر باشد زمان قرارگیری در شرایط تاریکی بیشتر خواهد بود. القاء ریشه در تاریکی نتایج بهتری را نسبت به القاء در روشنایی داشته است، به‌طور مشابه گراسل و همکاران (۱۳) ریشه‌زایی ریزساقه‌های گردو را با القاء ۸ روزه در تاریکی به‌دست آوردند، دوره تاریکی کوتاهتر ریشه‌زایی را با شکست مواجه می‌کند. همچنین مشابه با این نتایج، کابونی و لاری(۳) نیز ریشه‌زایی بهتری از ساقه‌های گردو در تاریکی نسبت به روشنایی به‌دست آوردند. غلظت‌های بالاتری از ایندول استیک اسید[1] درون‌زاد در ساقه‌های گردو در تاریکی کشت داده شده نسبت به روشنایی گزارش شده است (۲۵).

ظرفیت ریشه‌زایی گردو، وابسته به میزان اکسین درون‌زاد و غلظت اکسین موجود در محیط کشت است (۲۷). این‌گونه به‌نظر می‌رسد که اکسین استفاده شده در محیط کشت القاء برای ریشه‌زایی، نقش تحریک کنندگی برای ساخت اکسین درون‌زاد ایفا می‌کند، اکسین موجود در محیط کشت منجر به بیان و تجمع ایندول استیک اسید و ایندول استیل آسپاراتیک[2] در منطقه القاء ریشه در ۱۲-۶ ساعت می‌شود. تجمع ایندول استیک اسید موجب رشد ونمو غیرطبیعی سلول‌های تولیدکننده آن شده و ممکن است ریشه‌زایی به‌خاطر این تجمع و یا به‌خاطر ناکافی بودن ایندول استیک اسید برای انتقال به سلول‌های مجاور، مهار شود (۹). علت انتقال نمونه‌ها پس از القای ریشه به محیط نمو ریشه، تغییر دادن غلظت هورمون‌ها و همینطور تغییر میزان نمک‌های محیط کشت می‌باشد. بر این اساس در تحقیق حاضر با هدف کاهش غلظت نمک و تحریک ریشه‌زایی در این مرحله از آزمایش، از محیط کشت با غلظت یک چهارم DKW استفاده شد. به این علت که با کاهش نمک، انگیزش ریشه و ریشه‌زایی تسریع می‌شود (۳۱).

در ادامه با هدف بررسی نقش هم‌افزایی لیگنوسولفانات و اکسین آزمایش دوم با دو سطح اکسین (۵ و ۷ میلی گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید) و سه سطح لیگنوسولفانات طراحی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر مصرف ایندول بوتیریک اسید، لیگنوسولفانات و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد برای دو صفت درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها معنی‌دار شد (جدول تجزیه واریانس ذکر

1- IAA
2- IAAsp

نشده است). نتایج مقایسه میانگین صفت درصد ریشه‌زایی نشان داد مصرف لیگنوسولفانات در غلظت ۱ گرم در لیتر همراه با ۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید سبب افزایش قابل توجه درصد ریشه‌زایی (۶۱/۵٪) نسبت به نتایج آزمایش اول (۴۹/۱٪) بود (جدول ۲) البته با افزایش مصرف لیگنوسولفانات درصد ریشه‌زایی کاهش یافت که ممکن است در اثر سمیت این ترکیب باشد (شکل ۳).

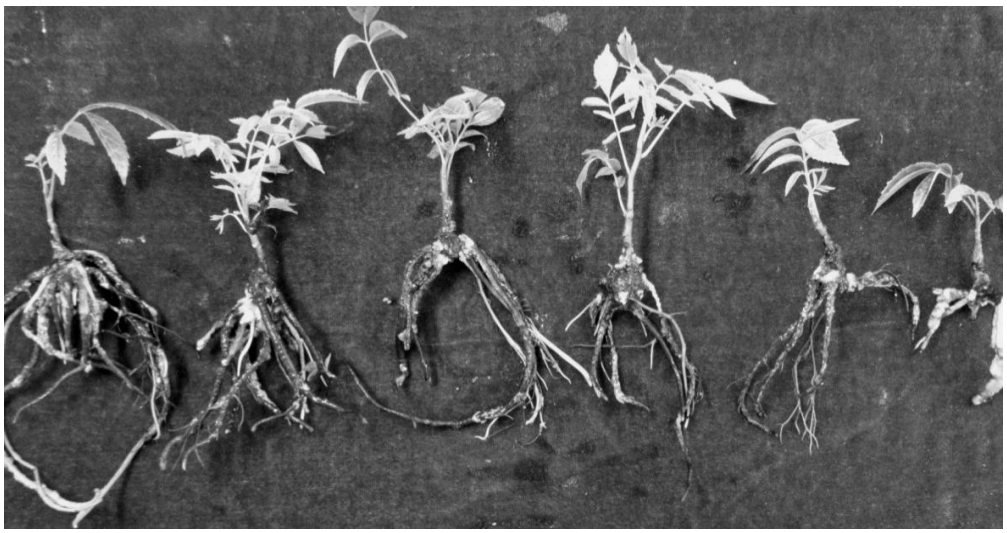
جدول ۲- اثر متقابل غلظت‌های مختلف لیگنوسولفونات × IBA در مدت زمان القای ۷ روزه برطول ریشه ریزساقه‌های گردو رقم 'هارتلی'

Table 2- Interaction effect of different concentrations of IBA × lignosulfunate in 7 days induction period on rooting length of walnut cv. 'Hartley' cultivar

طول ریشه Root Length (cm)	مدت زمان القاء Induction Period (Number of Days)	غلظت لیگنوسولفونات LIGN (g/l)	غلظت ایندول بوتیریک اسید IBA (mg/l)
8.30a	7	1	5
7.60b	7	1	7
7.32b	7	2	5
5.12c	7	2	7
5.07c	7	3	5
4.80d	7	3	7

حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح **۱** درصد دارای تفاوت معنی‌دارنمی‌باشند.

Similar letters in each column are not significant at 1% of probability level based on Duncan's multipile range test.



شکل ۳- ریشه‌زایی ریزساقه‌های گردو رقم 'هارتلی' در غلظت‌های مختلف لیگنوسولفونات و ۵ میلی گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (از چپ به راست غلظت لیگنوسولفونات افزایش داده شده است.) در طول مدت القای ۷ روز

Figure 3- Rooted microshoots of walnut cv. 'Hartley' in different concentration of LIGN and 5 mgl^{-1} IBA (LIGN concentration was increased from left to right) in in an induction period (7 number of Days)

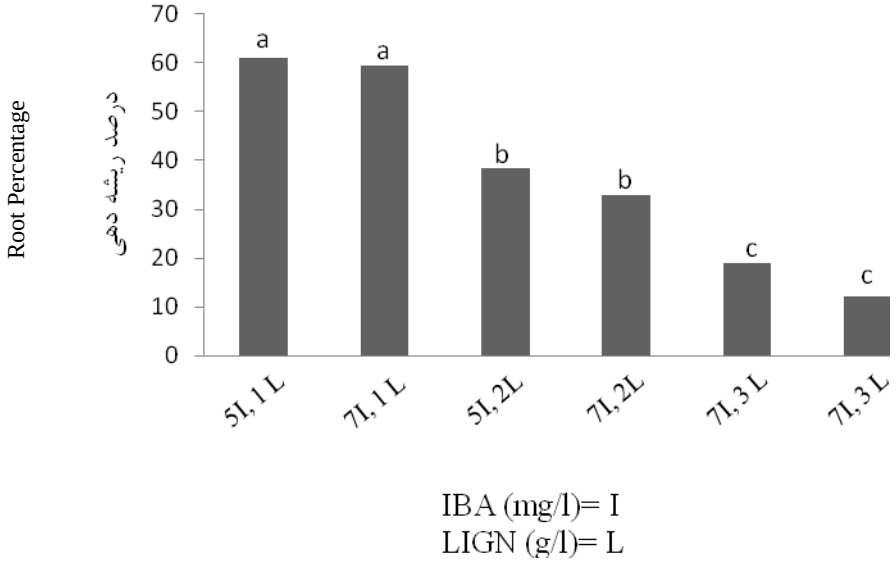
غلظت‌های بالاتر از ۳ گرم در لیتر لیگنوسولفانات باعث زردشدگی و نکروزه شدن و در نهایت سبب از بین رفتن ریزساقه‌ها در هر دو رقم شد.

مشخص شد که با افزایش میزان لیگنوسولفانات میزان ریشه‌زایی کاهش می‌یابد (شکل ۲). بالاترین میزان ریشه‌زایی در غلظت ۱ گرم در لیتر لیگنوسولفونات (۶۱/۵٪) و کمترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۳ گرم در لیتر لیگنوسولقونات (۱۳/۰٪) مشاهده شد (شکل۳). بجز مقدار ۱ گرم در لیتر لیگنوسولفانات در ترکیب با ۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید سایر مقادیر بالاترآن نسبت به تیمارهای شاهد ریشه‌زایی، افزایشی نشان ندادند (شکل ۴). همچنین مشابه با نتایج به دست آمده از آزمایش‌های ما، کورس و همکاران (۱۷) از چندین سیستم کشت درون شیشه‌ای مانند، کالوس، تکثیر تودهٔ ساقه‌ای و ریشه‌زایی قلمه‌ها استفاده کردند و مشخص شد که لیگنوسولفونات بر روی رشد، تکثیر شاخه و ریشه‌زایی اثر مفیدی دارد. با توجه به مشاهدات هاسمن و همکاران (۱۵) و گاسپر و همکاران (۱۱) مشخص شده زمانی‌که لیگنوسولفونات ریشه‌زایی را تحت تأثیر نفتالین استیک اسید[1] افزایش داد موجب افزایش میزان اکسین ایندول استیک اسید

1- NAA

درون‌زاد نیز شد.

در مجموع نتایج این آزمایش نشان داد مصرف ۱ گرم در لیتر لیگنوسولفانات همراه با ۵ میلی گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید و دوره تاریکی ۷ روز اثر مثبت قابل توجهی بر درصد ریشه‌زایی رقم گردو هارتلی دارد و می تواند به عنوان یک آزمایش موفق در ریزازدیایی گردو بطور تجاری توصیه شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایشات انجام شده برای ریشه‌زایی گردو توسط وحدتی و همکاران (۳۲) و جی-آلمند و همکاران (۱۶) که ریشه‌زایی به‌ترتیب ۳۷/۱-۵۸/۵ درصد و ۱۵-۵۰ درصد را به‌دست آوردند نتایج این آزمایش مبنی بر به‌کار بردن پلیمر لیگنوسولفانات به همراهی اکسین نتایج ارزشمندی در زمینه حل مشکل ریشه‌زایی گردو در شرایط کشت درون شیشه‌ای عرضه کرده است (ریشه‌زایی در حدود ۶۱ درصد).



شکل ٤- تاثیرات متقابل غلظت‌های مختلف لیگنوسولفونات × ایندول بوتیریک اسید بر درصد ریشه‌زایی گردو رقم 'هارتلی'. حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند

Figure 4- Interaction effect of different concentrations of LIGN × IBA on rooting percentage of walnut cv. 'Hartley'. Similar letters in each column are not significant at 1% of probability level based on Duncan's multiple range test

شکل ٥- گیاهان سازگار شده گردو رقم 'هارتلی' در گلدان

Figure 5- Adapted plants of walnut cv. 'Hartley' in pot

دراین آزمایش، محیط کشت ریشه‌زایی ترکیب شده با پلیمر سنتزی لیگنوسولفانات یک محیط کشت ریشه‌زایی جدیدی را تولید می‌کند که برای اولین بار برای بهبود ریشه‌زایی گردو مورد آزمایش قرار گرفت. این محیط کشت جدید غلظت مناسبی از لیگنوسولفانات را شامل می‌شود که ظرفیت ریشه‌زایی ریزساقه‌های گردو را بهبود می‌بخشد، اگرچه اطلاعات دقیق در مورد اثر متقابل مواد غذایی و لیگنوسولفانات به‌طور واضح مشخص نیست. مکانیسم عمل این پلیمر و مواد غذایی در محیط کشت ریشه‌زایی نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

گیاهان ریشه‌دار شده تحت تیمار لیگنوسولفونات و سازگار شده با محیط در شکل ۵ نشان داده شدند.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، به‌منظور ریشه‌زایی ریزشاخه‌های رقم هارتلی گردوی ایرانی دو آزمایش طراحی و اجرا شد. در اولین آزمایش اثر ایندول بوتیریک اسید به‌تنهایی و در آزمایش دوم اثر ترکیب این اکسین با سینرژیست لیگنوسولفونات برای اولین بار روی گردو بررسی شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در این آزمایش‌ها مشخص شد که ایندول بوتیریک اسید در غلظت‌های ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر و مدت زمان القاء ۷ روز بالاترین درصد ریشه‌زایی را داشت. بنابراین این دو غلظت برای انجام آزمایش بعدی انتخاب شدند. بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار ۱ گرم در لیتر لیگنوسولفونات در ترکیب با ۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید ایجاد شد. نتایج حاصل از استفاده از این ماده که برای اولین بار روی ریشه‌زایی گردوی کشت بافتی مورد آزمایش قرار گرفت نشان داد که استفاده از سینرژیست لیگنوسولفونات برای غلبه بر مشکل ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گردو مفید می‌باشد.

منابع

1- Bahrami H., Vahdati K., Aflaki M., Bahrami S. 2009. Efficient Protocol of Regeneration of Walnut by using Somatic Embryos. p. 29-34. In The 6th National Biotechnology Congress of Iran, 13-15 Aug. 2009. Milad Tower Conference Hall, Tehran, Iran.

2- Barbas E., Jay-Allemand C., Doumas P., Chaillou S., Cornu D. 1993. Effects of gelling agent on growth, mineral composition and naphthoquinone content of in vitro explants of hybrid walnut tree (*Juglansregia* × *Juglansnigra*). Annual Science Forestry (Paris) 50, 177-186.

3- Caboni E., Damiano C. 2005. In vitro propagation of walnut (*Juglansregia*L.): Critical factors for the induction of the rooting response. ActaHorticulturae. 705, 329-333.

4- Cheng T.Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsugamenziensii*Mirb, Franco). Plant Sience. 5, 97-102.

5- Caboni E., Lauri P. 1995. Effetto di fattorichimici, fisici e trasformazionelocalizzatasullaradicazione in vitro di noce. ItalusHortus 4(2):49-53.

6- Cheniany M., Ebrahimzadeh C., Masoudi-nejad A., Vahdati K., Leslie C. 2010. Effect of endogenous phenols and some antioxidant enzyme activities on rooting of Persian walnut (*Juglansregia*L.). African Journal of Plant Science. Vol. 4(12):479-487.

7- Cornu D., Jay-Allemand C. 1989. Micropropagation of hybrid walnut trees (*Juglansnigra* × *Juglansregia*) through culture and multiplication of embryos. Annual Science For (Paris) 46 (Supplement), 113s-116s.

8- Driver J.A., and Kuniyuki A.H. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. Horticulture Science 19, 507-509.

9- Duroux L., Fontaine F., Breton C., Charpentier J., Doumas P., Jay-Allemand C. 1997. Biology of Root Formation and Development A. Altman, and Y. Waisel, (Eds). Plenum Press, New York, 75.

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

11- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D., Thorpe T. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue cultures. In Vitro Cellular and developmental Biology 32:272-289.

12- Gross D., Parthier B. 1994. Novel natural substances acting in plant growth regulation. Journal of Plant Growth Regulation 13:93-114.

13- Gruselle R., Badia N., Boxus Ph. 1987. Walnut micropropagation, first results, ActaHorticulturae, 212:221-230.

14- Hasey J.K., WesterdahlBB.,MickeWc., Ramos D.E., Yeater J.T. 2001. Yield performance of ownrooted 'Chandler' walnut versus 'Chandler' walnut on Paradox rootstock. ActaHorticulturae 544, 489–493.

15- Hausman J., Kevers C., Gaspar T. 1995. Auxin-polyamine interaction in the control of the rooting inductive phase of poplar shoots in vitro. Plant Science 110:63-71.

16- Jey-Allemand C., Capelli P., Cornu D. 1992. Root development of in vitro hybrid walnut micro cuttings in a vermiculite containing gelrite medium. Scientia Horticulturae 51, 335-342.

17- Kevers C., Coumans M., De Greef W., Jacobs M., Gaspar T. 1981. Organogenesis in habituated sugarbeet callus: auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. Zeitschrift fur pflanzenzuchtung journal of plant breeding 101:79-87.
18- Leslie C., McGranahan G. 1992. Micropropagation of Persian walnut (*Juglansregia*L.). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 18. High-Tech and micropropagation. Springer, Berlin, pp. 136-150.
19- Lloyd G., McCown B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kamia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proceeding of the Plant Propagator Society. 30, 421-427.
20- López J.M. 2001. Field behavior of self-rooted walnut trees of different cultivars produced by tissue culture and planted in Murcia (Spain). ActaHorticulturae 544, 543–546.
21- McGranahan G., Driver J.A., Tulecke W. 1987. Tissue culture of Juglans In: Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3, (Bonga J.M.&Durzan D.J., eds.), MartinusNijhoff, Dordrecht, pp. 261-271.
22- McGranahan G., Leslie C., 1988. In vitropropagation of mature Persian walnut cultivars. HortScience. 23, 220.
23- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15, 473-479.
24- Pei Z., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen GJ., Grill E., Schroeder JI. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. Nature 406: 731–734.
25- Redig P., Shaul O., Inze D., Van Montagu M., Van Onckelen H. 1996. Levels of endogenous cytokinins indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. FEBS Letters 391:175–180.
26- Revilla M.A., Majada J., Rodriguez R. 1989. Walnut (*Juglansregia*L.) micropropagation. Annual Science Forestry (Paris) 46 (Suppl.), 149s-151s.
27- Ríos D., Sánchez-Olate M., Decarli M., Feito M., Rodríguez R. 2005. Bases moleculares delenraizamiento. In: Sánchez-Olate, M. & Ríos, D. (Eds) Biotecnología vegetal enespeciesleñosas de interésforestal. Facultad de CienciasForestales, Universidad de Concepción, Chile pp. 79–93.
28- Saadat Y., Hennerty M. 2001. Effects of different *in vitro* and *ex vitro* treatments on the rooting performance of Persian walnut (*Juglansregia* L.) microshoots. ActaHorticulturae 544, 473–480.
29- Sun Q., Sun H., Bell L. 2009. Effect of polyvinyl alcohol on in vitro rooting capacity of shoots in pear clones (Pyruscommunis L.) of different ploidy. Plant Cell Tissue Organ Culture (2009) 99:299–304.
30- Telysheva G., Lebedeva G., Zaimenko N., Grivinya D., Dizhbite T., Virzina O. 1997. Novel lingo-silicon products promoting root system development. In: Altman A, Waisel Y. Biology of root formation and development. New York and London, Plenum Press 92-93.
31- Vahdati K., Leslie C., Zamani Z., McGranahan G. 2004. Rooting and acclimatization of in vitro grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. HortScience. 39, 324-327.
32- Vahdati, K., Razaee, R. and Mirmasoomi, M. 2009.Micropropagation of some dwarf and early mature walnut genotypes. Biotechnology 8: 171-175.
33- Van der Krieken W.M., Kodde J., Visser M., Tsardakas D., Blaakmeer A., de Groot K., Leegstra L. 1997. Increased induction of adventitious rooting by slow release auxins and elicitors. In: Altman A, Waisel Y. Biology of root formation and development. New York and London: Plenum Press 95-104.
34- Yamashita TT., inventor. 1996. Method and composition for promoting and controlling growth of plants. US patent 5549729.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 327-337
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۳۳۷-۳۲۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Effect of Lignosulfunateon Rooting of Micropropagated Walnut

M. Aflaki Jalali[1]- A. Hatamzadeh[2*]- H. Bahrami Sirmandi[3]

Received: 03-02-2016
Accepted: 21-12-2016

Introduction: Tissue culture is an effective technique for mass propagation of walnut that has many advantages. Plants were obtainedby *in vitro* techniques in comparison with *in vivo*techniques areableto producet fruitearlier. However one of the major problems in walnut micropropagation is the difficulty of rooting. Auxin protection against auxin-oxidase system can make a major contribution to rooting. Among all the compounds that can play the synergistic role with auxin, they will probably have the ability of auxin protection against enzymes. In this experiment, the effect of lignosulfunate on rooting of micropropagated walnut was investigated for the first time.

Materials and Methods: In this experiment, Hartley cultivar of walnut was used. At first, explants were washed under running water for 1 hour then explants were placed in 70% alcohol for 1 minute and after that in 10% bleach for 10 minutes. After sterilization, under laminar air flow hood, explants were washed three times with distilled water and werecultured on Driverand Kuniyuki, 1984(DKW) medium supplemented with 2.2 g l^{-1}phytagel, 2 mg l^{-1} BA, 0.01 mg l^{-1} IBA and 30 gl^{-1} sucrose (establishment stage). In multiplication stage, plantlets were subcultured every 25 days. All of the plantlets were placed in jars and were kept inside a growth chamber in photoperiod of 16 hours of light. All the multiplicated shoots were used as explants for the trails. Twodifferenttestswere usedto induceroot in explants. At the first trial, explants were transferred to induction medium containing IBA (3, 5, 7 and 10 mg l^{-1}) and treatmentswere placedin thedark for 3, 5and7 days. Treatments related to theconcentrations of5and7 mg l^{-1}IBAand7 daysof darknesshadthe highestpercentage ofrooting. In the next experiment, thecombination ofthree levels oflignosulfunate (1, 2 and 3 g l^{-1}), and two concentration of 5and7mg l^{-1}IBAwere used. Treatmentswere placedindarknessfor 7 days. After root induction,shootlets were transferred to root development medium. Rootdevelopmentmedium includesa quarteroftheDKWand vermiculite.

Results and Discussion: The aim of the first trial was to determine the concentration of IBA which produced the highest percentage of rooting. Among all the auxins, it was shown in other experiments that IBA has the best results in rooting of walnut. Due to this, we chose IBA as root induction hormone. With increasing of IBA concentrations and the induction period, rooting increased. Because the higher amount of exogenous auxin will induce the higher amount of endogenous auxin (IAAsp). However, rooting increased to a certain level and then began to decrease. With increasing concentrations above 10 mgl^{-1} IBA rooting reduced and formation of callus in the shoot end increased which is not good for rooting because callus would not let the cells form roots. It seems that accumulation of IAAsp induces self-productive cells in root area to grow and duplicate abnormally and maybe root formation stops because of this accumulation and also because of the inadequacy of the IAAsp to transfer to neighboring cells. Also with increasing concentration, defoliation and wilting happens. A lower concentration of IBA (about3 mgl^{-1}) caused loss of rooting. The highest percentage of rooting for the first treatment with IBA was with 5 mgl^{-1} IBA and 7 days of darkness and 7 mgl^{-1} IBA and 7 days of darkness. The treatments were placed in darkness due to degradation of auxin under light condition. The induction time was related to auxin concentration. If the auxin concentration is less, the exposure time in the dark will be more. Root induction in the dark had better results than induction in light. The capacity of rooting in walnut is related to the amount of endogenous (IAAsp) and exogenous auxin. The amount of endogenous auxin is completely related to the cultivar and thatis why some cultivars respond really well to the amount of exogenous hormones in rooting stage. Exogenous auxin induces the production of endogenous auxin (IAAsp). These two concentrations were chosen for next treatment with lignosulfunate. Rootingratedecreaseswith increasinglignosulfunate. However, the highest root induction among all the treatments wasachieved on medium containing 1 g l^{-1}lignosulfunate. The

1- M.sc. Graduated Student in Plant Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture Science, Guilan University, Rasht, Iran
2- Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture Science, Guilan University, Rasht, Iran
(*- Corresponding Author Email: hatamzadeh@guilan.ac.ir)
3- M.sc. Graduated Student in Plant Crop Production, Department of Horticulture, Campus of Abureyhan, Tehran University, Tehran, Iran

reason of transferring all explants after root induction to root development medium was changing the hormone and salts concentrations. At this stage, the ¼ DKW was used as a medium. This is due to the reduction of salts, root induction and rooting accelerate.

Conclusions: In this study, the effect of lignosulfunate (auxin synergist) on rooting stage of Hartley cultivar of walnut was investigated. For this goal, two trials were done. The first trial was to determine the best concentration of IBA for rooting. Two concentrations were chosen and another trial was the effect of the combination of lignosulfunate with IBA on rooting. For the first time in this study, we showed that lignosulfunatecan improve rooting of walnut.

Keywords: Indole butyric acid, Rooting, Synergist, Tissue Culture, Walnut