Optimization of Tissue Culture Medium and the Combination of Growth Regulators to Increase Plantlet Production Efficiency in Walnut Micropropagation

Introduction

In our country, walnut tree propagation is traditionally done through seed cultivation, often resulting in seed rot and death due to fungal, bacterial, and viral contamination (MC Granahan et al., 1986; Driver and Kenyuki, 1984; Saadat and Henry, 2002). The traditional method, in addition to low multiplication rates, leads to high variation in resulting seedlings, potential loss of seedlings due to contamination, and reduced efficiency in subsequent stages (Unit, 2012; Kaur et al., 2006). Previous research has mainly utilized concentrations of one milligram per liter of benzyl adenine along with small amounts of indole butyric acid for Iranian walnut growth and enrichment (Rodrigues, 1982; Revilla et al., 1989; Penuela, 1988; Mejzadeh et al., 2010, 1997; Amiri and Qaraati, 2012; Riosleal et al., 2012). This research aims to build upon and optimize previous work, evaluating the effectiveness of different concentrations of two growth regulators, benzyl aminopurine and adenine sulfate, on walnut plantlet regeneration and growth traits in tissue culture.

Materials and Methods

This study was conducted to optimize the tissue culture protocol for the "Chandler" cultivar walnut and determine the most suitable culture medium and hormonal composition for micropropagation. Lateral and terminal buds from the current season's branches were sterilized and cultured in DKW medium containing 2 mg/liter of benzyl adenine hormone and 100 mg/liter of indole butyric acid hormone, with polyvinyl pyrrolidine at one g/liter and activated charcoal at 2 g. Two-factorial experiments were used to process and multiply the plant after the establishment phase. The first factor was DKW culture medium containing five levels of adenine sulfate (0, 20, 40, 60, and 80 mg/liter), and the second factor was benzylaminopurine plant growth regulator with five hormonal levels containing 0, 0.5, 1, 1.5, and 2 mg/liter in combination with 0.01 mg/liter of indole butyric acid hormone. DKW base culture medium without any plant growth regulating substances was considered as control. After two months, growth traits including plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets per plantlet were measured in different culture media. The resulting data were statistically analyzed using SAS 9.1 software, and means were compared using Duncan's multiple range test with a five percent probability level.

Results and Discussion

The analysis of variance showed that both plant growth regulators, benzyl aminopurine and adenine sulfate, had a very significant effect at the 1% probability level on plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets. The interaction effect of benzyl aminopurine with adenine sulfate treatment on plantlet weight and stem length was significant at the 1% probability level. However, the interaction effect of benzyl aminopurine with adenine sulfate treatment on the number of leaves, number of buds, and number of leaflets was not significant. The results indicated that an increase in the levels of growth regulators benzyl aminopurine and adenine sulfate led to an increase in plantlet weight. The positive effects of increasing the levels of growth regulating substances in increasing plantlet weight are likely due to their direct effect on nutrient absorption, utilization, and the photosynthesis process. These results align with the research of Hatemzadeh et al. (2017) and Saadat and Henrati (2002). The positive effects of higher concentrations of both growth regulators on the increase in the number of sprouts and the lack of significant difference between the two high

concentrations confirm that the use of high levels does not exceed the economic threshold. It can be justified that in excessive and unconventional concentrations, positive effectiveness is not achieved, but it can also impose more costs on the walnut tissue culture program. The appropriate concentration of BAP and adenine sulfate increases the leaf surface through the effect on cell divisions, resulting in receiving more light radiation and increasing the rate of photosynthesis. It seems that the two growth regulating substances in the appropriate concentration intensified each other's effect, affecting the rate of absorption and utilization of materials from photosynthesis, leading to an increase in the fresh and dry weight of the seedling. This, in turn, leads to a decrease in the length of the reproduction period in the resulting seedlings and an increase in the efficiency of the seedling production in walnut tissue culture.

Conclusion

The use of both studied growth regulators significantly increased plantlet weight, stem length, number of leaves, number of buds, and number of leaflets compared to the control treatment. Plantlet growth was achieved when plant growth regulators were used, and in the absence of these substances, no growth was seen in the plantlet. All assessed traits increased significantly with the addition of plant growth regulators, with the highest trait amounts obtained with the simultaneous use of benzyl aminopurine and adenine sulfate.

Keywords: Tissue culture, Proliferation, Growth traits, Plant growth regulators

نسخه پیش انتشار

بهینه‌سازی محیط کشت و ترکیب ماده تنظیم کننده رشد در افزایش راندمان تولید گیاهچه در ریزازدیادی گردو

مرضیه قربانی*، خسرو پرویزی، محمد یزدان دوست، داراب حسنی

Email: ghorbanimarzieh25@yahoo.com

چکیده

این تحقیق به منظور بهینه سازی دستورالعمل کشت بافت گردو و تعیین بهترین محیط کشت و ترکیب ماده تنظیم کننده رشدی در ریزازدیادی گردو، در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان اجرا شد. جوانه‌های جانبی و انتهایی گردو رقم چندلر، از قسمت میانی شاخه‌های سال جاری، برداشت شده و پس از مراحل سترون‌سازی در شرایط استریل داخل محیط کشت پایه DKW حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم کننده رشد بنزیل‌آدنین و مقدار یک‌صدم میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم کننده رشد ایندول بوتریک اسید، یک گرم بر لیتر پلی وینیل پیرولیدین و ۲ گرم ذغال فعال کشت شدند. پس از مرحله استقرار که با تورم و سرسبزی جوانه‌ها و عدم وجود هر نوع علائم نکروزه و رنگ‌پریدگی آن‌ها همراه بود، به منظور پرآوری، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. بدین منظور از محیط کشت DKW حاوی ماده تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین در پنج سطح با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بوتیریک اسید به عنوان فاکتور اول و پنج سطح مختلف آدنین سولفات (۰، ۲۰ و ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان فاکتور دوم، مورد استفاده قرار گرفت. پس از دو ماه شاخص‌های رشد شامل صفات وزن گیاهچه، طول ساقه نورسته، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه در هر گیاهچه، در محیط کشت‌های مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، دو ماده تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات اثر بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر صفات مورد بررسی نشان دادند. متناسب با افزایش غلظت در هر دو ماده تنظیم‌کننده رشد، میزان پرآوری و رشد گیاهچه‌ها افزایش پیدا کرد. به طوریکه در محیط کشت‌های حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات در مقایسه با سایر غلظت‌ها، اثرات مثبت قابل توجهی در کلیه صفات مورد بررسی ایجاد گردید.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، پرآوری، صفات رشد، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی

مقدمه

کشور ایران از رویشگاه‌های مهمی است که در آن گردو (*Juglans regia* L.) بصورت گسترده کشت می‌شود به طوری که در اکثر کشورها گردو را به نام گردوی ایرانی و به اصطلاح انگلیسی Persian Walnut می‌شناسند و به احتمال زیاد بذر آن در زمان‌های گذشته از ایران به برخی کشورهای دیگر منتقل شده است. مجموعه وسیعی از ژنوتیپ‌های مرغوب و نامرغوب در اکثر نقاط ایران از جمله همدان، قزوین، طالقان، آذربایجان، مازندران، سمنان، نجف آباد، فارس، کردستان، کرمان و ...به صورت مخلوط کشت می‌شود (Mohammadinejad et al., 2013). با استناد به آمارنامه کشاورزی (2020) سطح زیر کشت گردو در کشور ۱۶۵۱۰۰ هکتار و در استان همدان ۱۷۶۶۴ هکتار می‌باشد که بالاترین سطح زیر کشت گردو در کشور را دارا می‌باشد. میزان تولید محصول و عملکرد آن در کشور به ترتیب ۲۶۱۲۶۲ تن،

۱۷۲۰ کیلوگرم در هکتار و در استان همدان ۶۳۰۲۵ تن و ۳۰۵۴ کیلوگرم در هکتار بوده و استان همدان رتبه اول را در تولید این محصول دارا می‌باشد (Anonymous, 2020). تولید نهال سالم گردو یکی از موضوعات مهمی است که در خصوص آن مطالعات گسترده‌ای انجام شده است. تکثیر درخت گردو در کشور ما اغلب به طریق سنتی از طریق جنسی (کشت بذر) انجام می‌گردد. تعداد زیادی از بذورکشت شده به دلیل وجود آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی دچار پوسیدگی شده و از بین می‌روند (Driver and Kuniyuki, 1984; Saadat and Hennerty, 2002).

در روش سنتی تکثیر گردو، معمولا در یک هکتار حدود ۱۰۰ هزار بذر کشت می‌گردد و در شرایط مطلوب می‌توان انتظار داشت که حداکثر حدود ۵۰ تا ۶۰ هزار نهال بدست آید. ضمن این‌که از یکنواختی برخوردار نیستند، با تأخیر قابل توجهی نیر در باردهی همراه می‌باشند. پیوند این پایه‌های بذری علاوه بر ضرورت تهیه پیوندک از ارقام سازگار و با ویژگیهای برتر، به مراقبت‌های ویژه جهت جوش خوردن و ایجاد ترکیب پیوندی بادوام و پایدار نیز نیاز دارد. در مواردی هم ممکن است که با وجود آلودگی‌های بذرزاد سبب کاهش راندمان موفقیت در جوش خوردن پیوندک در مراحل پس از پیوند بشود (McGranahan and Leslie, 1988; McGranahan et al., 1986; Vahdati, 2005; Kaur et al., 2006). در مجموع ضریب پایین تکثیر و وجود آلودگی‌های پنهان از مهمترین مشکلات تکثیر بذری گردو می باشد (Somerz et al., 1982; Driver and Kuniyuki, 1984).

بوسلا و میکلر (Bosela and Michler, 2008) در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه دریافتند که بنزیل آدنین، تیدیازرون (TDZ) و زآتین (ZEA) هر سه بر بازایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها را فقط در غلظت ۵/۵–۱۲ میکرومولار بنزیل آدنین و غلظت ۵ –۲۵ میکرومولار زآتین مشاهده نمودند همچنین به برتری زآتین نسبت به بنزیل آدنین برای افزایش طول شاخساره اشاره نمودند اما اضافه نمودند که این تأثیر مثبت در غلظت‌های پایین اتفاق افتاده و در غلظت‌های بالاتر، باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن گردیده است.

وحدتی و همکاران (Vahdati et al., 2004)، در بررسی ریشه‌دار کردن و سازگاری جوانه‌های رشد یافته آزمایشگاهی در ارقام گردوی ایرانی، از سه رقم گردو Ghendler، Sunland و Vina و محیط کشت DKW حاوی BA Mμ 4.4 +M IBAμ 0.05 و ۳۰ گرم ساکارز و ۲ گرم بر لیتر فیتاژل استفاده نمودند. پس از ۷ روز، جوانه‌ها با طول ۳–۴ سانتیمتر برش داده شده و به مدت یک هفته به محیط کشت MS حاوی ۱۵ میکرومولار اسید ایندول بوتریک اسید و۳۰ گرم ساکارز و ۹ گرم بر لیتر آگار و تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتیگراد منتقل شدند. پس از آن به مدت ۲۸ روز به روشنایی منتقل گردیدند. در ادامه فرایند ریشه‌زایی، پس از ۲۸ روز، از محیط کشت DKW و ورمیکولیت با نسبت ۱ به ۱/۲۵ و ۳۰ گرم ساکارز و ۲ گرم فیتاژل که در اتوکلاو استریل گردید استفاده نمودند و گیاهچه‌های ریشه‌دار را تولید کردند.

وحدتی و همکاران (Vahdati et al., 2008) در تحقیق دیگری که به منظور بهینه¬سازی محیط کشت گردو انجام دادند، اعلام نمودند که برخی از ارقام گردو به مقدار مواد معدنی بیشتری از آنچه در محیط کشت DKW به کار رفته است نیاز دارند و استفاده از مقادیر بیشتر میواینوزیتول و مس می‌تواند در درصد رشد و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گردو موثر باشد.

پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (Paygamzadeh and Kazemitabar, 2011) اثر ماده تنظیم کننده رشدی بنزیل آمینو پورین، اسید ایندول استیک اسید و ژنوتیپ را بر روی جنین‌های رسیده گردو بررسی نمودند و محیط کشت DKW حاوی مقدار ۰/۱میلی‌گرم بر لیترBAP و یا محیط دارای ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با مقدار ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر IBA را بهترین محیط کشت، برای تولید گیاهچه از جنین‌های رسیده معرفی نموده و به طور کلی اعلام

نمودند هنگامی که از دو ماده تنظیم کننده رشد همزمان استفاده گردد، درصد جوانه‌زنی افزایش می‌یابد به نحوی که درصد جوانه‌زنی را در محیط اولی ۴۹/۳۲ ٪ و در دومی ۶۷/۷۶ ٪ گزارش نمودند.

در تحقیقی که توسط محمدی نژاد و همکاران (Mohammadinejad et al., 2013) بر روی ریزازدیادی گردو ژنوتیپ ۳۰۵ و Z60 انجام گرفت، اثر دو نوع محیط کشت DKW و WPM (۳۰ گرم بر لیتر ساکارز + ۸ گرم آگار + یک گرم بر لیتر پلی وینیل پیرولیدین PVP) و اثر سه غلظت ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین را با مقادیر صفر، ۰/۵ و یک میکرومولار را بررسی نمودند و محیط DKW را به عنوان محیط کشت برتر معرفی نمودند

یاری و همکاران (Yari et al., 2008) اثر فصل و نوع ریزنمونه را بر کشت گردو در شرایط Invitro بر روی رقم Z63 و Z60 بررسی نمودند. آن‌ها در زمان‌های مختلفی اقدام به نمونه‌گیری و کشت کردند و در نهایت بهترین زمان نمونه‌گیری را اواخر اردیبهشت ماه و بدترین زمان را مرداد ماه و تک گره برگی را به عنوان بهترین ریزنمونه معرفی نمودند.

احتشام نیا و غلامی (Ehteshamnia and Gholami., 2014) در بررسی میزان قهوه‌ای شدن بافت‌ها در شیوه‌های مختلف کشت بافت گردو، اثر دو محیط کشت MS و DKW حاوی ذغال فعال و آسکوربیک اسید را بر روی دو رقم ایرانی چندلر و جمال بررسی نمودند و محیط کشت DKW حاوی ۲ گرم بر لیتر ذغال فعال را به عنوان بهترین محیط کشت معرفی نمودند. در آزمایش دیگری آنها جوانه‌ها را قبل از کشت به مدت ۲ ساعت در محلول‌های مختلف (آب، PVP و آسکوربیک اسید) قرار دادند و اعلام نمودند ریزنمونه‌های قرار گرفته در محلول PVP از نظر طول جوانه، وزن‌تر جوانه و تعداد برگ بهتر از نمونه‌های قرار گرفته در محلول آسکوربیک اسید بوده و همچنین این نمونه‌ها بهتر از آب عمل می‌کنند. این موضوع نشان می‌دهد استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند PVP می‌تواند مانع قهوه‌ای شدن بافت‌ها در فرایند کشت بافت گردد.

هاشمی دهکردی و همکاران (Hashemidehkordi et al., 2020) استفاده همزمان از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات را در پینه‌زایی و اندام‌زایی در گیاه شیپوری گلدانی موثر دانسته‌اند. اثرات مفید آدنین سولفات در باززایی مریستم از کشت بافت سیب زمینی هنگامی که در ترکیب با BAP استفاده می شود، به اثبات رسیده است (Bhuiyan,2013). استفاده همزمان از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات را در جهت القای اندام زایی در محیط کشت WPM در ریزازدیادی توس توسط نظری و همکاران (Nazari et al., 2017) توصیه شده است. عرب و همکاران (Arab et al., 2003) نیزاستفاده همزمان از محیط کشت MS حاوی ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده تنظیم کننده رشد 2ip را درریزازدیادی رویان خرمای مضافتی محیط مناسب معرفی نمودند.

یکی از بهترین راه‌کارها برای مبارزه با بیماری‌ها و احداث باغ‌های یکنواخت با خصوصیت ژنتیکی یکسان و تولید محصول یکنواخت و با ارزش و بازار پسندی بالا، جهت صادرات به بازارهای جهانی استفاده از تکنیک کشت بافت و ریزازدیادی آن‌ها می‌باشد. تا زمانی که تولید این‌گونه نهال‌ها به تعـداد کـافی و قیمت مناسب صورت نگیرد، امکان اصلاح باغات موجود و توسعه باغات فنی جدید در کـشور وجـود نخواهد داشت. از طرفی موفقیت در ریزازدیادی گردو و میزان پرآوری ریزنمونه‌ها و نیز درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل با نوع و ترکیب محیط کشت و غلظت‌های مختلف آن‌ها و درجه اکسایندگی ترکیبات محیط کشت در جذب و خنثی سازی تانن‌ها، آلکالوئیدها و دیگر موارد بازدارنده رشد ارتباط تنگاتنگ دارد. بنابراین این تحقیق با هدف تکمیل و بهینه‌سازی دستورالعمل قبلی و ارزیابی کارآیی غلظت‌های متفاوت از دو ماده تنظیم‌کننده رشد بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات بر میزان باززایی و نیز صفات رشد گیاهچه‌های تولیدی گردو در کشت بافت به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

ابتدا جوانه‌های جانبی و انتهایی گردو رقم چندلر، از قسمت میانی شاخه‌های سال جاری در اواخر اردیبهشت ماه، برداشت شدند. پس از جدا کردن برگ‌ها، ساقه‌های سالم و عاری از آفت و بیماری در محیط آزمایشگاه به قطعات کوچک تقسیم شده و به مدت یک ساعت در زیر آب جاری شسته شدند. سپس با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. پس از آن نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر استریل شسته شده و در زیر دستگاه لامینارفلو به مدت بیست دقیقه در محلول دو درصد هیپو کلرید سدیم حاوی چند قطره توین بیست و مواد آنتی بیوتیک قرار گرفتند. به منظور حذف مواد فنلی از ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پلی وینیل پیرولیدین به مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. سپس نمونه‌ها سه مرحله و در هر مرحله به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شد. پس از مراحل سترون‌سازی در شرایط استریل، نمونه‌ها داخل ظروف شیشه مربایی که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه DKW،30 گرم بر لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین، یک صدم میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید، یک گرم بر لیتر پلی وینیل پیرولیدین (PVP)، ۲ گرم ذغال فعال و ۷ گرم بر لیتر آگار و PH برابر ۵/۷ بود، کشت گردیدند. نمونه‌های کشت شده به مدت یک هفته در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری شدند و پس از آن به فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. به منظور کاهش میزان مواد فنلی، نمونه‌ها هر هفته یکبار در محیط کشت مشابه واکشت شدند.

پس از مرحله استقرار، به منظور پرآوری و ریزازدیادی گیاه از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت مجزا و در سه تکرار استفاده شد. بدین منظور مواد تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین در پنج سطح مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بوتیریک اسید به عنوان فاکتور اول و آدنین سولفات در پنج سطح مختلف (۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان فاکتور دوم مد نظر قرار گرفت. محیط کشت پایه DKW فاقد هر گونه مواد تنظیم کننده رشد گیاهی، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از دو ماه شاخص‌های رشدی شامل صفات وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه در هر گیاهچه، در محیط کشت‌های مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

داده‌های حاصل، با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱)، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات اثر بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه نشان دادند. همچنین اثر متقابل تیمار بنزیل آمینوپورین در آدنین سولفات نیز بر وزن گیاهچه و طول ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید اما اثر متقابل تیمار بنزیل آمینو پورین در آدنین سولفات بر تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه معنی‌داری نشد.

بیشترین وزن گیاهچه (۵۷/۶۷ میلی‌گرم) در تیمار با ماده تنظیم کننده رشدی حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات مشاهده شد که به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار گرفت. پس از آن، به تیمار حاوی ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین در ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات بیشترین وزن گیاهچه را تولید کردند که در گروه دوم و جداگانه از سایر تیمارها قرار گرفت. کمترین وزن گیاهچه (صفر میلی‌گرم) در تیمار فاقد بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات ایجاد گردید که به تنهایی در گروه آخر قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی گیاهچه و صفات رشد گردو رقم چندلر.

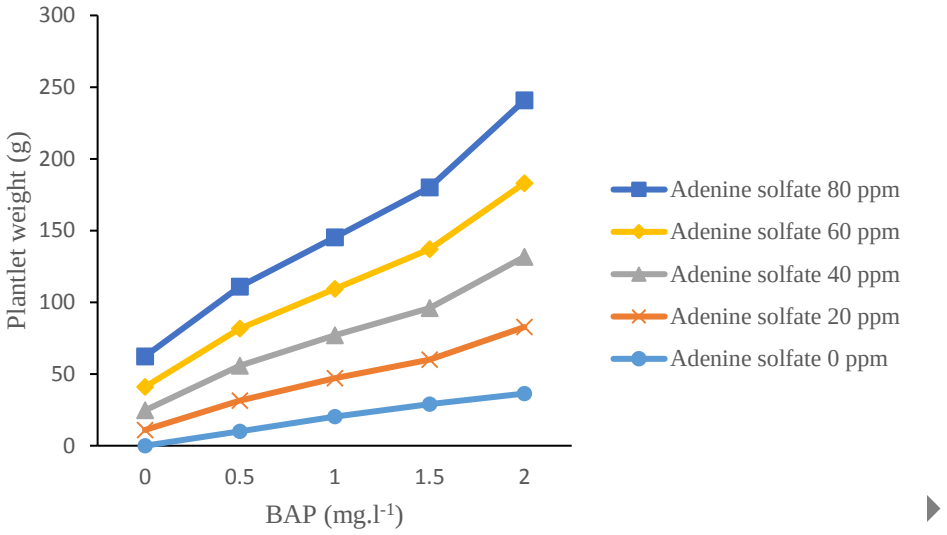
Table 1- Variance analysis of the effect of plant growth regulators on plantlet regeneration and growth traits of walnut cultivar "Chandler".

Source of Variations S.O.V	d.f	Means of Squares (MS)				
		Plantlet weight	Stem length	Leaf number	Bub number	Leaflet number
BAP	4	1893.73**	1395.54**	14.61**	19.44**	487.96**
Adenine Sulfate	4	654.01**	2111.77**	5.86**	7.99**	198.89**
BAP× Adenine Sulfate	16	28.72**	53.55**	0.15ns	0.41ns	198.89ns
Error	50	7.44	9.29	0.53	0.59	7.55
C.V		9.16	7.95	25.55	21.28	18.35

ns، * و **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: Non-significantly difference and significantly difference at 5 and 1% probability levels, respectively.

با نتایج حاصله و بر اساس شکل ۱ مشخص شد که با افزایش سطوح مواد تنظیم کننده رشده بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات، وزن گیاهچه افزایش یافته است (شکل ۲). اثرات مثبت افزایش سطوح مواد تنظیم کننده رشد در افزایش وزن گیاهچه به طور قطع ناشی از تاثیر مستقیم این مواد بر افزایش سرعت جذب و بکارگیری مواد غذایی و تاثیر مستقیم آن بر فرآیند فتوسنتز می‌باشد. این نتایج با پژوهش افلاکی و همکاران (Aflaki et al., 2017) و نیز سعادت و هنرتی (Saadat and Henertty, 2002) با اثرات غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و ساکارز و تاثیر مثبت آن‌ها در غلظت‌های بالاتر بر افزایش وزن گیاهچه همسو می‌باشد.



شکل ۱- اثر متقابل ماده تنظیم کننده رشدی بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات بر وزن گیاهچه ۸ هفته پس از کشت.

Figure 1- The interaction effect of the BAP and adenine sulfate growth regulators on plantlet weight 8 weeks after cultivation.

۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP

۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP

۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP

۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP

شکل ۲- رشد گیاهچه گردو در تیمارهای مختلف بنزیل آمینو پورین ۸ هفته پس از کشت.

Figure 2- The growth of walnut plantlets in different benzyl aminopurine treatments in 8 weeks after cultivation.

جدول۲- مقایسه میانگین اثر متقابل بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات بر صفات رشد گیاهچه گردو.

Table 2- Means Comparison of the interaction effect of benzylaminopurine and adenine sulfate on the growing traits of walnut plantlets.

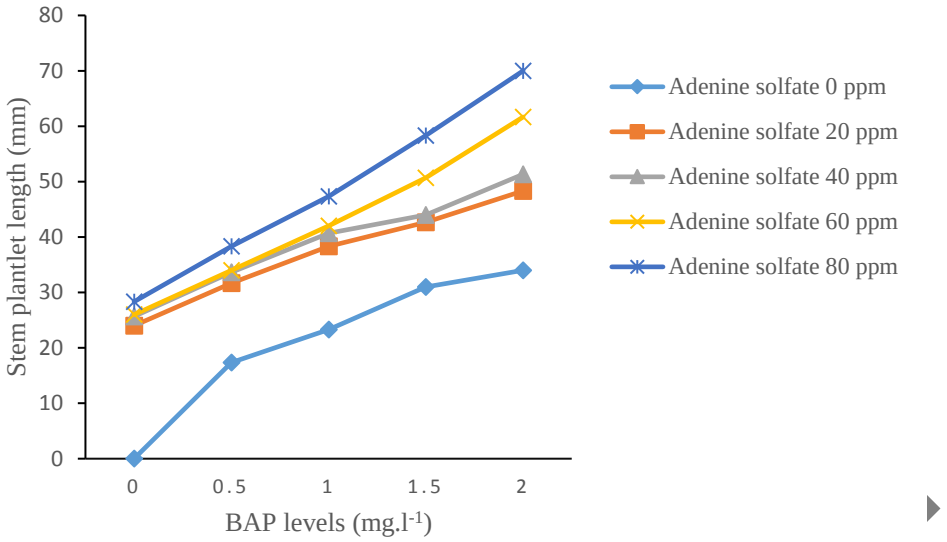
	Plant growth regulators		**Means of Growing traits**				
Treatments	AD mg/l	BAP mg/l	Plantlet weight (g)	Stem length (cm)	Leaf number	Bub number	Leaflet number
1	0	0	0.00 p	0.00 n	0.00 i	0.00 ij	0.00 n
2	20	0	12.00 o	24.33 ml	1.00 hi	1.33 ij	12.00 mn
3	40	0	13.67 o	26.33 jklm	1.33 ghi	1.67 hi	13.67 mn
4	60	0	16.33 no	28.33 jkl	1.67 fgh	2.00 ghi	16.33 lm
5	80	0	27.00 hijk	30.33 lj	2.00 efgh	2.67 efgh	27.00 ijkl
6	0	0.5	19.00 mn	22.00 m	1.67 fgh	2.33 fghi	19.00 jkl

7	20	0.5	25.00 jkl	33.67 hi	2.00 efgh	3.33 cdef	25.00 ghijk
8	40	0.5	24.33 kl	38.33 fg	2.67 cdef	3.67 bcde	24.33 fghijk
9	60	0.5	26.00 ijkl	42.67 ef	3.33 bcd	4.33 abc	26.00 efghi
10	80	0.5	29.33 ghij	48.33 cd	3.33 bcd	4.33 abc	29.33 defgh
11	0	1	21.67 lm	24.67 klm	2.00 efgh	2.67 efgh	21.67 kl
12	20	1	26.67 hijk	34.00 ghi	3.00 bcde	3.67 bcde	26.67 fghijk
13	40	1	30.00 fghi	40.67 ef	3.33 bcd	4.33 abc	30.00 fghij
14	60	1	32.33 efg	44.00 de	3.33 bcd	4.00 bcd	32.33 defgh
15	80	1	34.33 def	51.33 c	۳/۳۳ bcd	4.67 ab	34.33 bcd
16	0	1.5	25.67 ijkl	25.67 klm	2.33 defg	3.00 defg	25.67 hijk
17	20	1.5	30.67 fgh	35.67 gh	3.33 bcd	4.00 bcd	30.67 cdefg
18	40	1.5	36.00 de	41.00 ef	3.67 abc	4.67 ab	36.00 bcde
19	60	1.5	41.00 c	50.67 c	4.00 a	4.67 ab	41.00 cdef
20	80	1.5	40.67 c	61.67 b	3.67 abc	4.65 ab	40.67 bc
21	0	2	33.00 efg	29.00 jk	3.00 bcde	4.00 bcd	33.00 fghij
22	20	2	38.00 cd	38.33 fg	3.67 abc	4.33 abc	38.00 bcd
23	40	2	45.67 b	47.33 cd	4.00 a	3.67 bcde	45.67 bcd
24	60	2	49.00 b	58.33 b	4.00 ab	5.33 a	49.00 b
25	80	2	57.67 a	70.00 a	4.67 a	5.33 a	57.67 a

میانگین‌های با حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف نشان ندادند.

Means with common letters based on Duncan's multiple range test did not show differences at the 5% probability level.

بیشترین طول گیاهچه (۷۰ میلی‌متر) در تیمار ماده تنظیم کننده رشدی حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات و کمترین طول گیاهچه (صفر میلی‌متر) در تیمار فاقد بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات ایجاد شد (جدول ۲ و شکل ۳).

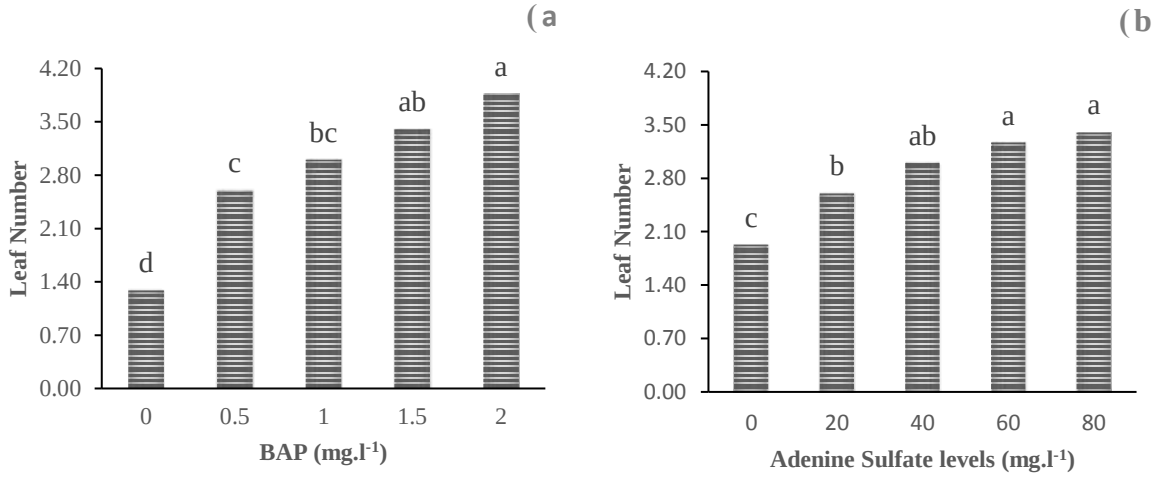


شکل ۳– اثر متقابل ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات بر طول گیاهچه ۸ هفته پس از کشت.

Figure 3- The interaction effect of the BAP and adenine sulfate growth regulators on plantlet length 8 weeks after cultivation.

با بررسی اثرات متقابل ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پیورین و آدنین سولفات (شکل ۳) مشخص شده است که در غلظت‌های پایین ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین، خطوط نمودار بهم نزدیکتر هستند و با افزایش غلظت ماده تنظیم کننده رشدی، فاصله خطوط بیشتر شده و طول گیاه به صورت قابل توجهی افزایش می‌یابد. بوسلا و میکلر (Bosela and Michler, 2008) در آزمایشی برای تعیین مؤثرترین سیتوکینین در شاخه‌زایی گردوی سیاه (*Juglans nigra*) دریافتند که هر سه ماده بنزیل آدنین، تیدیازرون (TDZ) و زآتین (ZEA) بر بازایی شاخه مؤثرند اما طویل شدن شاخه‌ها را فقط در غلظت ۵/۵–۱۲ میکرومولار بنزیل آدنین و غلظت ۵ –۲۵ میکرومولار زآتین مشاهده نمودند. همچنین به برتری زآتین نسبت به بنزیل آدنین برای افزایش طول شاخساره اشاره نمودند اما بیان نمودند که این تأثیر مثبت در غلظت‌های پایین اتفاق افتاده و در غلظت‌های بالاتر، باعث بروز عارضه شیشه‌ای شدن گردیده است که با نتایج حاصل از این آزمایش مغایرت دارد. کپینک و کلاقاضی (Kepenek and kolagasi, 2016) در ریزازدیادی گردو، بیشترین درصد بازازایی، بلندترین طول ساقه و بیشترین درصد رشد را در محیط کشت NGE دارای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازرون همراه با ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید به دست آوردند. مدینا و همکاران (Medina et al., 2011) بهترین و بیشترین رشد جوانه انتهایی را در ریزازدیادی گردوی ونزوئلایی در محیط حاوی ۰/۳، ۱/۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۲۳ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به دست آوردند.

مقایسه میانگین تعداد برگ در گیاهچه و در سطوح مختلف ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین نشان داد که بیشترین تعداد برگ (۳/۸۷ عدد) در مقدار دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین نداشت اما با تیمار فاقد بنزیل آمینو پورین(۱/۲۹ عدد) اختلاف معنی‌دار نشان داد. همچنین با مقایسه میانگین تعداد برگ در گیاهچه در سطوح مختلف آدنین سولفات مشخص شد که از پنج سطح مورد بررسی، چهار سطح تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند اما تفاوت آنها با سطح فاقد آدنین سولفات معنی‌دار شد. بیشترین تعداد برگ (۳/۴ عدد) مربوط به تیمار پنجم (۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات) و کمترین تعداد برگ (۱/۹ عدد) مربوط به تیمار اول (صفر میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات) بود (شکل ۴ a و b).



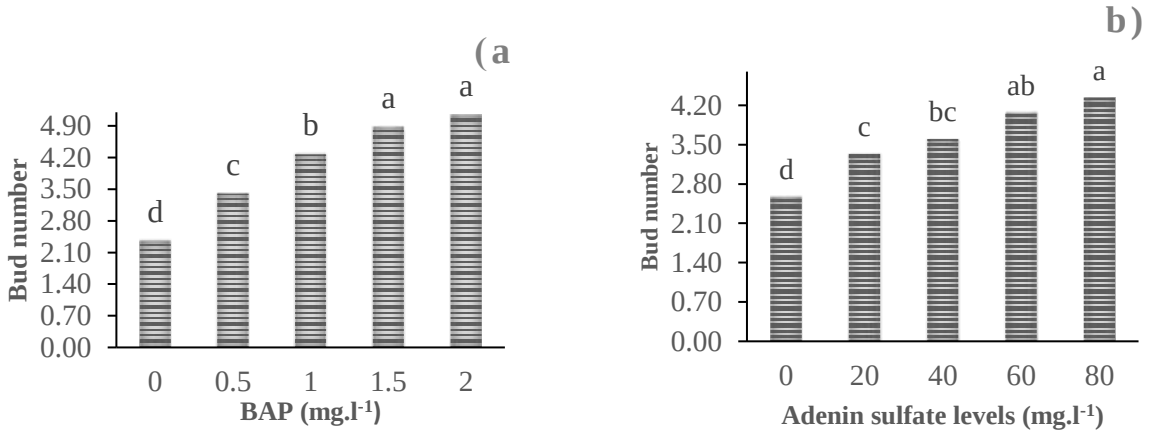
شکل ۴- متوسط تعداد برگ در گیاهچه با مقادیر مختلف ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین (a) و آدنین سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت در گیاهچه گردو.

Figure 4- The mean number of leaves in the plantlet with different amounts of the growth regulator benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation in the walnut plantlets.

مقایسه میانگین تعداد جوانه در گیاهچه با سطوح مختلف ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین نشان داد که سطوح مورد بررسی در چهار گروه مختلف قرار گرفتند. بیشترین تعداد جوانه (۴/۵۳ عدد) مربوط به سطح پنجم ماده تنظیم کننده رشدی (دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین) بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار چهارم نداشت اما تفاوت آنها با سایر سطوح بنزیل آمینو پورین معنی‌دار بود و کمترین تعداد جوانه (۱/۶۴ عدد) مربوط به تیمار فاقد بنزیل آمینو پورین بود (شکل ۵ a).

مقایسه میانگین تعداد جوانه در گیاهچه با سطوح مختلف آدنین سولفات نشان داد که از پنج سطح مورد بررسی، چهار سطح تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند اما تفاوت آن‌ها با سطح فاقد آدنین سولفات معنی‌دار بود. بیشترین تعداد جوانه (۴/۳۳ عدد) مربوط به تیمار پنجم (۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات) و کمترین تعداد جوانه (۲/۵۷ عدد) مربوط به تیمار اول (صفر میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات) بود (شکل ۵ b).

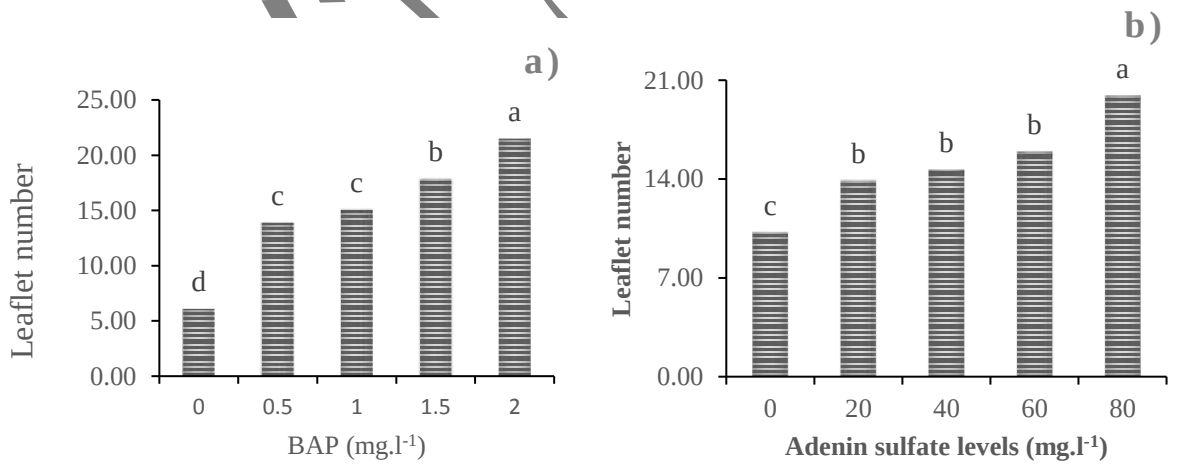
نقش سایتوکینین‌ها در گیاهان به‌عنوان محرک تقسیم سلولی، ممانعت از پیری برگ‌ها و جلوگیری از تخریب کلروپلاست و تحریک سنتز کلروفیل محرز شده است، که نتیجه آن می‌تواند با افزایش تعداد جوانه در گیاهچه، تعداد برگ و نهایتا وزن تر گیاهچه همراه باشد. در این پژوهش اثرات مثبت غلظت‌های بالاتر از هر دو تنظیم کننده رشد بر افزایش تعداد جوانه و عدم تفاوت معنی‌دار بین دو غلظت بالا، موید این موضوع می‌باشد که استفاده از سطوح بالا در زمانی که از آستانه اقتصادی تجاوز نکند، قابل توجیه بوده و در غلظت‌های بیش از حد و غیر متعارف نه تنها اثربخشی مثبتی حاصل نمی‌شود بلکه می‌تواند هزینه بیشتری به برنامه کشت بافت گردو تحمیل نماید. یاری و همکاران (Yari et al., 2014) بیشترین درصد تعداد جوانه، بیشترین تعداد جوانه حاوی کالوس و بلندترین طول جوانه و همچنین بیشترین وزن تر در هر گیاهچه را در مقدار ۰/۸ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازرون و بنزیل آدنین به دست آوردند.



شکل ۵- متوسط تعداد جوانه در گیاهچه با مقادیر مختلف ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین (a) و آدنین سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت در گیاهچه گردو.

Figure 5- The mean number of buds in the plantlet with different amounts of the growth regulator benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation in the walnut plantlets.

مقایسه میانگین تعداد برگچه در گیاهچه در سطوح مختلف ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین نشان داد که پنج سطح مورد بررسی در گروههای کاملا متفاوت از همدیگر قرار گرفتند. بیشترین تعداد برگچه (۲۱/۴۷ عدد) مربوط به سطح پنجم (دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین) و کمترین تعداد برگچه (۲/۵۷ عدد) مربوط به تیمار فاقد بنزیل آمینو پورین بود (شکل ۶ a). در مقایسه میانگین تعداد برگچه در گیاهچه با سطوح مختلف آدنین سولفات مشخص شد که پنج سطح مورد بررسی در سه گروه متفاوت قرار گرفتند. بیشترین تعداد برگچه (۱۹/۸۷ عدد) مربوط به سطح پنجم (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات) و کمترین تعداد برگچه (۱۰/۲۱ عدد) مربوط به تیمار فاقد آدنین سولفات بود (شکل ۶ b).



شکل ۶- متوسط تعداد جوانه در گیاهچه با مقادیر مختلف ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین (a) و آدنین سولفات (b) در ۸ هفته پس از کشت در گیاهچه گردو.

Figure 6- The mean number of buds in the plantlet with different amounts of the growth regulator benzyl aminopurine (a) and adenine sulfate (b) in 8 weeks after cultivation in the walnut plantlets.

با تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تاثیر مواد رشد گیاهی بر فرایند فتوسنتز انجام گرفته است، مشخص شده است که کاربرد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف هم در تنظیم فتوسنتز و هم در حرکت فرآورده‌های فتوسنتزی از محل تولید آنها در برگ به مقصد نقش اساسی دارد (Tsonev et al., 1998). غلظت مناسب BAP

و آدنین سولفات از طریق اثر بر تقسیمات سلولی باعث افزایش سطح برگ شده که نتیجه آن دریافت بیشتر تشعشع نوری و افزایش سرعت فتوسنتز می‌باشد. در این بین به نظر می‌رسد که دو ماده تنظیم کننده رشد در غلظت مناسب اثر همدیگر را تشدید کرده و با تاثیر بر سرعت جذب و بکارگیری مواد حاصل از فتوسنتز، منجر به افزایش وزن تر و خشک گیاهچه گردیده‌اند. در این وضعیت با قابلیت انتقال گیاهچه‌های تولیدی به محیط ریشه‌زایی به نوبه خود منجر به کاهش طول دوره تکثیری در گیاهچه‌های حاصل و افزایش راندمان تولید گیاهچه در کشت بافت گردو می‌شود. نتایج مشابهی از تاثیر BAP بر رشد و باززایی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت گردو در پژوهش‌های پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (Kazemitabar and Payghamzadeh,Paygamzadeh 2010 &2011) نیز حاصل گردیده است هاشمی دهکردی و همکاران (Hashemidehkordi et al., 2020) استفاده همزمان از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین‌سولفات را در پینه‌زایی و اندام‌زایی در گیاه شیپوری گلدانی موثر دانسته‌اند. اثرات مفید آدنین سولفات در ترکیب با BAP بر پرآوری و رشد گیاهچه‌های سیب‌زمینی در گزارش بویان (Bhuiyan, 2013) نیز به اثبات رسیده است. همچنین استفاده همزمان از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آدنین سولفات را در جهت القای اندام زایی در محیط کشت WPM در ریزازدیادی توس توسط نظری و همکاران (Nazari et al., 2017) و همچنین عرب و همکاران (Arab et al., 2003) توصیه شده است.

شکل ۷- گیاهچه ریشه‌دار چندلر در محیط کشت DKW حاوی ۶ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتریک اسید.

Figure 7- Rooted plantlets of "Chandler" in DKW culture medium containing 6 mg/liter indole butyric acid.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج کلی آزمایش مشخص شد که کاربرد هر دو ماده تنظیم کننده رشد مورد مطالعه، باعث افزایش معنی‌دار وزن گیاهچه، طول ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و تعداد برگچه نسبت به تیمار شاهد شدند. درصد قابل توجهی از رشد گیاهچه‌ها هنگام استفاده از مواد تنظیم کننده رشد گیاهی حاصل شد و در صورت عدم استفاده از این مواد، هیچ رشدی در گیاهچه دیده نشد. همه صفات مورد ارزیابی با اضافه شدن مقادیر مواد تنظیم کننده رشد گیاهی افزایش قابل توجه داشتند ضمن اینکه بالاترین میزان صفات در گیاهچه‌ها در استفاده همزمان از بنزیل آمینو پورین و آدنین سولفات حاصل گردید.

REFERENCES

1. Aflaki, M., hatamzadeh, A., & Bahrami sirmandi, H. (2017). The Effect of Lignosulfunate on Rooting of Micropropagated Walnut. *Journal of Horticultural Science*, 31(2): 327-337. (In Persian with English abstract). https://doi.www. 10.22067/jhorts4.v0i0.52658
2- Amiri, M. E., & Gharati, S. (2012). Influence of medium composition on multiplication of walnut (*Juglans regia* L.) growth. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(8): 1482-1485. https://doi: 10.5897/JMPR11.1491
3- Anonymous. (2020). Agricultural statistics. The first volume: Crops. Ministry of Agricultural Jihad, Planning and Economic Deputy. Information and Communication Technology Center. 125 p. (In Persian).
4- Arab, R., Jafari mofid abadi, A., Majd, A. & Dehghan-Shoreki, Y. (2003). In vitro proliferation of date palm (Phoneix dactylifera L. cv. Mazafeti) plantlet derived from embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and *Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 11(2): 171-180. (In Persian with English abstract). https://doi: 10.22092/ijrfpbgr.2003.115495
5- Bhuiyan, F. R. (2013). In vitro meristem culture and regeneration of three potato varieties of Bangladesh. *Research of. Biotechnolnology*, 4, 29-37. https://doi:journal/index.php/rib/article/view/2432
6- Bosela, M. J., & 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. https://doi:10.1007/s11627-008-9114-5
7- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut (Juglans hindsii × Juglans regia) rootstock. *Hort Science*, 19: 507-509. https://doi: 10.4236/adr.2022.104033
8- Ehteshamnia, A., & Gholami, M. (2014). Inhibition of Persian walnut (*Juglans regia* L.) micro cuttings browning by utilizing different methods. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* (JBES), 5 (2) 562-571.
9- Hashemidehkordi E, Mortazavi S N., & Azadi P. (2020). Callus production and organogenesis in pot calla lily (*Zantedeschia* spp. cv. Orania). FOP; 5 (1):13-18. URL: http://flowerjournal.ir/article-1-167-fa.html
10- Kaur, R., Sharma, N., Kumar, K., Sharma, D.R., & Sharma, S. D. (2006). In vitro germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. *Scientia Horticult*, 109: 385-388. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.05.012
11- Kepenek, K., & Kolagasi, Z. (2016). Micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Physica Polonica*. 130(1): 150-156. https://doi: 10.12693/APhysPolA.130.150.
12- Mohammadinejad, S., Gholami, M., & Ezni Ashari, M. (2013). The effect of culture media and cytokinin on the primary steps of walnut micro propagation, selected genotype. *Plant Production*, 37(3): 83-92. (In Persian with English abstract).
13- Nazari, J., Payam noor, V., Alizadeh, M., & Ghasemi Bezdi, K. (2017). Micropropagation of birch (Betula litwinowii) from leaf callus. Forest and Wood Products, 70(2): 199-207. https://doi: 10.22059/jfwp.2017.62477
14- McGranahan, G.H., & Leslie, C.A. (1988). In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. *Hort Science*, 23: 220.
15- McGranahan, G.H., Tuleke, W., Arulsekar, S. & Hansen, J.J. (1986). Intergeneric hybridization in the Juglandaceae: Pterocarya sp x Juglans regia. *Journal of American Society Horticultural Science*. 111: 627-630. https://doi 10.1007/BF00269923.
16- Medina, A., Betancourt, M., & Ortiz, R. (2011). Initial development of in vitro propagation protocols for Caracas walnut Juglans venezuelensis, a critically endangered tree endemic to El Ávila National Park, northern *Venezuela. Conservation Evidence*, (2011), 8, 26-30. www.ConservationEvidence.com

17- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S. K. (2010). The effects of BAP and IBA and genotypes on in vitro germination of immature walnut embryos. *International Journal of Plant Products*, 4(4): 309-322 https://doi.org .10.22069/ijpp.2012.714

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

18- Rodriguez, R. (1982). Callus initiation and root formation from in vitro culture of walnut cotyledons. *Horticulture Science*, 17: 195–196. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00003-1

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

20- Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G., & Popova, L.P. (1998). A possible role for Jasmonic acidin adaptation of barley seedling to salinity stress. *Plant Growth regulation*, 17:153-159. https://doi.org 10.1007/PL00007029

21- Vahdati, K. Leslie, C. Zamani, Z. & McGranahan, G. H. (2004). Rooting and acclimatization of invitro – grown shoots from mature trees of three persion walnut cultivar. *Hortscience*, 39 (2): 324 – 327. https://doi.org 10.21273/HORTSCI.39.2.324

22- Vahdati, K. Najafian Ashrafi, E. Ebrahimzadeh, H. & Mirmasoumi, M. (2008). Improved micropropagation of walnut (juglans regia l.) On media optimized for growth based upon mineral content of walnut seed. *Acta Horticulturae* 839. https://doi.org 10.17660/ActaHortic.2009.839.13

23- Yari, M., Gholami, M., Esna-Ashari, M. & kheradmand, H. (2014). Effect of season and explant type on in vitro propagation of Juglansregia L. genotypes Z60 and Z63. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. Available online at www.ijagcs.com IJACS/2014/7-9/624-629 ISSN 2227-670X ©2014 IJACS Journal. Intl J Agri Crop Sci. Vol., 7 (9), 624-629.

24- Vahdati, K. (2005). Nursery management and grafting of walnut. Khaniran Publications, 113 pp.

نسخه پیش انتشار