نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ص. ۵۴-۴۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 1, Spring 2011, P. 45-54
ISSN: 2008 - 4730

اثر دو نوع محیط کشت، اسید جیبرلیک و چند فاکتور فیزیکی بر جوانه‌زنی جنین‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia* L)

کمال پیغام‌زاده[1*]- سید کمال کاظمی‌تبار[2] – امیر محتشم امیری[3]

تاریخ دریافت:۸۸/۹/۲۸
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۱/۱۲

چکیده

در این آزمایش اثر دو نوع محیط کشت، اسید جیبرلیک و شرایط تاریکی/سرما و روشنایی/گرما بر روی جوانه‌زنی جنین‌های بالغ یک گونه بومی گردو بررسی شد. میوه‌های بالغ ۲۲ هفته پس از گرده افشانی انتخاب شدند و پس از ضد عفونی جنین‌های بالغ همراه با قسمتی از قطعات کوتیلدونی استخراج شدند و سپس بر روی محیط کشت MT و DKW تغییر یافته که با غلظت‌های مختلفی از اسید جیبرلیک تهیه شده بود کشت شدند. سپس کشت‌ها به موقعیت‌های مختلف فیزیکی از جمله موقعیت کشت تاریکی با تیمار سرمایی (دمای ۲±۴ درجه سانتیگراد) و موقعیت کشت روشنایی با تیمار حرارتی (۱۶/۵ ساعت دوره نوری و دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد) منتقل شدند. اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت مختلف، غلظت‌های اسید جیبرلیک و فاکتورهای فیزیکی مشاهده شد. درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و طول شاخه اصلی در محیط کشت DKW تغییر یافته، موقعیت کشت تاریکی با تیمار سرما و ۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر بود. محیط کشت MT و موقعیت کشت تاریکی با تیمار سرمایی برای تکثیر ریشه نسبت به محیط کشت DKW تغییر یافته و موقعیت کشت روشنایی با تیمار گرمایی بسیار موثر بود. در این آزمایش اسید جیبرلیک اثر منفی بر روی رشد ریشه داشت، بطوریکه طول ریشه اصلی در صفر میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک نسبت به ۲ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک بیشتر بود. درصد جوانه‌زنی جنین‌ها هنگامی که تیمار سرمایی و اسید جیبرلیک به طور همزمان به کار برده شدند در مقایسه با هنگامی که آنها به طور جداگانه به کار برده شدند بیشتر بود (با ۶۳/۱۷ درصد جوانه‌زنی).

واژه های کلیدی: *Juglans regia* L، جوانه‌زنی جنین، محیط کشت MT، محیط کشت DKW تغییر یافته، اسید جیبرلیک

مقدمه

گردو در خانواده *Juglandacea* و در جنس *Juglans* طبقه بندی می‌گردد. جنس‌های *Juglans regia* (۲۷)؛ *J. nigra* (۱۲)؛ و *J. cinerea* (۲۵) از لحاظ اقتصادی برای تولید میوه مهم هستند. همچنین *J. nigra* (۱) برای تولید چوب، میوه، اسباب و اثاثیه خانه و هم به عنوان گونه‌ای با ارزش در اکولوژی دارای اهمیت ویژه‌ای است (۹). علاوه بر این موارد گردو دارای خواص دارویی نیز می‌باشد (۱۹).

مشکلات قابل ملاحظه‌ای برای ازدیاد رویشی گردو از طریق قلمه، پیوند، کشت بافت و غیره توسط افراد مختلفی گزارش شده است (۱۴، ۱۶، ۱۷، ۲۶، ۳۸، ۵۴ و ۵۶). ازدیاد این گیاه تحت شرایط طبیعی از طریق بذر صورت می‌گیرد. اما بذرهای این گیاه دارای کمون بوده و در نتیجه درصد جوانه‌زنی پایینی دارند. خواب بذر را می‌توان به وسیله پیش سرمادهی بذرها در دمای ۳ تا ۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ تا ۳ ماه همراه با رطوبت از بین برد که این فرایند چینه سرمایی نام دارد (۳، ۴، ۱۱، ۱۸، ۲۰، ۳۶ و ۳۷). علاوه بر این یکی از دلایل عدم توصیه ازدیاد از طریقه بذر وجود بیماری پاخوره (Canker) است که شواهد موجود دلالت بر این دارد که این بیماری از طریق بذر انتقال می‌یابد (۳۵). ازدیاد گردو از طریق قلمه بسیار مشکل است، این امر ناشی از توانایی کم آن در ریشه‌دهی است (۲۱ و ۲۸). بعضی از محققین گزارش کردند که ازدیاد گردو یک مسئله حل نشده باقیمانده است (۵ و ۴۷) و دلیل اصلی آن غالبا میزان

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر
(*- نویسنده مسئول: Email: Kamalpay@gmail.com)
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

ریشه‌دهی کم و نامنظم و همچنین میزان مرگ و میر زیاد گیاهان ریشه‌دار شده در مرحله سازگاری است. تحقیقاتی که اخیرا انجام شده است پیشنهاد می‌کنند که استوانه اسکلرانشیمی پیوسته‌ای که بافت‌های چوبی را در بر گرفته است از ریشه‌دهی یا ظهور ریشه‌ها ممانعت می‌کند (۶ و ۵۷). تکثیر گردو از طریق جنین‌زایی سوماتیکی به وسیله کارایی کم جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی کم آن به گیاهچه‌های کامل محدود می‌گردد (۳۶ و ۵۶).

در گردو جوانه‌زنی کم بذرها و دوره تکثیر طولانی آن (۲ تا ۳ ماه چینه سرمایی) مشکلات عمده در توسعه و تکثیر کولتیوارهای پر محصول حاصل از هیبریداسیون است. به کار بردن روش‌های باززایی گیاه از طریق کشت جنین در این ویترو به ما اجازه می‌دهد تا از طریق کوتاه کردن دوره اصلاحی، جلوگیری از سقط جنین در اثر ناسازگاری و همچنین تسریع جذب آب، مواد غذایی و اکسیژن به جنین بر موانع هیبریداسیون غلبه کنیم (۳، ۱۸ و ۴۰). علاوه بر موارد ذکر شده کشت جنین‌های نابالغ برای مطالعه فرایندهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی توسعه جنین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۲). همچنین با استفاده از این تکنیک می‌توان گیاهان را با قابلیت تکثیر بالایی به دست آورد، که این قابلیت به دلیل جوانی و پتانسیل باززایی زیاد جنین‌ها می‌باشد (۲۰).

محیط کشت و غلظت‌های یونی آنها یکی از مهمترین فاکتورهای کشت بافت و سلول گیاهی است. یکی از مشکلات اولیه در ازدیاد درون شیشه‌ای گردو عدم وجود محیط کشت مناسب است. برای حل این مشکل، محیط کشت جدیدی به نام DKW توسعه یافت (۸ و ۲۶) که برای ازدیاد هیبرید پارادوکس پایه‌ریزی شده بود. برای ریز ازدیادی گردو محیط‌های کشت مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است، از جمله؛ درایور و کونیوکی (۸) (DKW)؛ موراشیگ و اسکوک (۳۳) (MS)؛ گامبورگ و همکاران (۱۳) (B_5) و غیره. اگرچه محیط کشت DKW برای توسعه هیبرید پارادوکس بنیانگذاری شده بود، ولی آن به عنوان محیط کشت مناسبی برای گونه‌های دیگر خانواده گردوسانان، مانند *J. regia*، نیز مورد استفاده قرار گرفته است، بطوریکه اخیرا به طور وسیعی در کشت بافت گردو مورد استفاده قرار گرفت (۱، ۹، ۱۰ و ۱۴). همچنین درایور و کونیوکی (۸)؛ امام (۱۰)؛ هیله سادهولت و همکاران (۱۷)؛ مک گراناهان (۲۹) و سعادت و هنرتی (۴۹) برتری انواع محیط‌های کشت را برای ریزازدیادی گردو مورد بررسی قرار دادند و نامبردگان برتری محیط کشت DKW را نسبت به محیط‌های کشت دیگر را گزارش کردند. از طرفی سانچز زامورا و همکاران (۵۱) برای جوانه‌زنی جنین‌های بالغ *J. regia* برتری محیط کشت WPM را نسبت به محیط‌های کشت DKW و NGE را گزارش کردند. برای افزایش جوانه‌زنی جنین‌ها و تبدیل آنها به گیاهان کامل تلاش‌های بسیاری توسط محققین مختلف صورت گرفته است (۷، ۸، ۱۵، ۲۲، ۳۷، ۳۹ و ۴۶). جوانه‌زنی جنین‌های گردو تحت شرایط مختلف کشت توسط محققین مختلفی گزارش شده است (۱۹، ۳۷ و ۴۳). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که کاربرد هورمون جیبرلیک اسید و تیمار سرمایی بطور قابل ملاحظه‌ای درصد جوانه‌زنی جنین‌های گردو را افزایش می‌دهند (۱۱، ۱۹، ۳۷، ۵۰ و ۵۵). همچنین گزارش شده است که کاربرد همزمان تیمار سرمایی و هورمون اسید جیبرلیک اثرات افزایشی بر روی جوانه‌زنی جنین‌های گردو نسبت به هنگامی که آنها بطور جداگانه بکار برده شدند داشته است (۱۹ و ۳۷).

اهداف آزمایشی: هدف از این آزمایش بررسی اثرات دو نوع محیط کشت DKW[1] و MT[2]، دو غلظت متفاوت هورمون اسید جیبرلیک و دو موقعیت فیزیکی از جمله شرایط تاریکی/سرما و روشنایی/گرما و اثر متقابل این فاکتورها بر روی جوانه‌زنی جنین‌های بالغ یک گونه بومی گردوی ایرانی و رشد گیاهچه‌های حاصله تحت شرایط درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش میوه‌های بالغ گردوی بومی (*Juglans regia* L.) ۲۲ هفته پس از گرده افشانی از شهرستان گالیکش واقع در استان گلستان تهیه شد. برای ضدعفونی میوه‌های بالغ از روش ضدعفونی اسکالتسویانس و همکاران (۵۳) و سانچز زامورا و همکاران (۵۱) با کمی تغییرات استفاده شد. میوه‌های نابالغ پس از شستشوی سطحی تحت جریان شیر آب، در شرایط استریل شکافته شدند و مغز خوراکی آن با دقت استخراج شد و به مدت ۵ دقیقه با الکل ۷۰٪ تیمار گردید و سپس با هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند و پس از آن ۵ بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

پس از ضدعفونی مغز خوراکی، جنین‌های بالغ از قسمت‌های خوراکی میوه گردو همراه با قسمتی از قطعات کوتیلدونی جدا شدند و بر روی محیط‌های کشت DKW تغییر یافته و MT که با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیز شده و اسید جیبرلیک (صفر و ۲ میلیگرم بر لیتر) تهیه شده بودند کشت شدند. آگار به مقدار ۹ گرم بر لیتر به همه محیط‌های کشت اضافه شد. pH محیط‌های کشت با استفاده از NaOH و HCl یک نرمال در ۵/۸ تنظیم شد. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و در فشار ۱/۱ $kgcm^{-1}$ به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. هورمون جیبرلیک اسید تحت شرایط استریل با استفاده از فیلترهای واتمن سر سرنگی با اندازه منافذ ۰/۲ میکرون فیلتر شد و هنگامی که دمای محیط‌های

1- Driver and Kuniyuki Walnut medium (8).
2 - Murashige and Tucker medium (34).

کشت اتوکلاو شده به حدود ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد رسید به آن اضافه گردید تا به این طریق از تخریب آن در اثر حرارت جلوگیری شود. محیط کشت MT (۳۴) تغییر یافته محیط MS[1] (۳۳) می‌باشد که در محتوی مواد آلی با یکدیگر تفاوت دارند. مقادیر مواد آلی تیامین، پیریدوکسین و نیکوتین آمید محیط کشت MT چندین برابر محیط کشت MS است، به طوریکه این ویتامین‌ها می‌توانند اثرات مختلفی در فرایندهای بیولوژیکی و سلولی گیاه داشته باشند.

سپس کشت‌ها به موقعیت‌های مختلف کشت منتقل شدند. فاکتورهای فیزیکی مورد استفاده در این آزمایش عبارتند از: ۱-موقعیت کشت روشنایی با ۱۶/۵ ساعت دوره نوری که با لامپ‌های فلورسنت سفید سرد (۳۰۰۰ لوکس) و دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و ۲- موقعیت کشت تاریکی و تیمار سرمایی با دمای ۲±۴ درجه سانتیگراد. پس از ۱۰ روز همه کشت‌ها به موقعیت کشت یکسانی که شامل دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و ۱۶/۵ ساعت دوره نوری که با لامپ‌های فلورسنت سفید سرد تامین می‌شد انتقال داده شدند.

برای سازگاری گیاهچه‌های به دست آمده، گیاهان سالم و کاملا توسعه یافته که دارای ریشه‌های قوی بودند از محیط کشت بیرون آورده شدند و بمنظور پاک کردن بقایای آگار از ریشه‌ها، آنها تحت جریان شیر آب شستشو شدند. سپس گیاهچه های شسته شده به یک محیط کشت ضدعفونی شده پرلیت: ورمیکولیت (۱:۱) انتقال داده شدند. قبل از انتقال، ریشه گیاهچه‌ها با غلظت ۰/۱٪ از هورمون ایندول بوتیریک اسید تیمار شدند. در حین سازگاری، گیاهچه‌ها مرتبا تهویه، مه پاشی و آبیاری شدند.

این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصافی انجام شد بطوریکه هر تیمار دارای سه تکرار بود و در هر تکرار نیز ۴ ریز نمونه جنینی بالغ کشت شد. پس از ۳۰ روز درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌ها و شاخه‌ها یادداشت گردید. داده‌های به دست آمده از لحاظ آماری به وسیله نرم افزار SAS (۵۲) تجزیه و تحلیل شد و برای تعیین اثرات ساده و اثرات متقابل بین فاکتورها از آماره ANOVA استفاده شد. برای تعیین اختلافات موجود بین تیمارها در هر پارامتر از آزمون چند دامنه‌ای دانکن[2] ($P= 0.05$) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصله نشان داد که درصد جوانه‌زنی، طول شاخه و ریشه اصلی تحت تاثیر نوع محیط کشت، کاربرد هورمون اسید جیبرلیک و شرایط مختلف فیزیکی کشت قرار گرفته است (جدول ۱). جوانه‌زنی جنین‌ها در دو نوع محیط کشت MT و DKW تغییر یافته متفاوت بود (در سطح احتمال ۱٪) به طوریکه درصد جوانه‌زنی در محیط کشت DKW تغییر یافته بیشتر از محیط کشت MT بوده است (شکل ۱a؛ جدول ۲). رشد شاخه‌ها در محیط کشت DKW تغییر یافته بیشتر از محیط کشت MT بود (شکل ۱c). نوع محیط کشت در سطح احتمال ۱٪ بر رشد و توسعه ریشه‌ها اثر گذاشت، بطوریکه رشد و توسعه ریشه‌ها در محیط کشت MT بهتر و بیشتر از محیط کشت DKW تغییر یافته بود (جدول ۲). ریشه‌هایی که در محیط کشت DKW تغییر یافته رشد کرده بودند علائم سوختگی را در بخش‌های راسی ریشه خود نشان دادند (شکل ۱b) بطوریکه چنین علائمی در نوک ریشه‌های گیاهچه‌های رشد کرده در محیط کشت MT مشاهده نشد (شکل ۱d). محیط کشت DKW تغییر یافته از لحاظ غلظت یونی غنی تر از محیط کشت MT است و این سوختگی راسی ریشه‌ها ممکن است در نتیجه حضور غلظت یونی بیشتر در محیط کشت DKW تغییر یافته باشد. نتایج حاصله از این آزمایش نشان داد که گردوی ایرانی برای تکثیر شاخه‌ها و جوانه‌زنی جنین‌ها به محیط کشت پایه با غلظت نمکی بالایی نیاز دارد و محیط کشت DKW محیط کشت مناسبی برای این منظور است. محیط کشت DKW غلظت نمکی نسبتا بالا دارد که از لحاظ محتوی نیتروژن مشابه محیط کشت MS و MT است، اما علاوه بر این، این محیط کشت دارای غلظت‌های زیادی از چندین یون دیگر است. مقایسه غلظت‌های یونی موجود در محیط های کشت DKW تغییر یافته، MT، MS و WPM ازدیاد یون‌های کلسیم، فسفات، آهن، منیزیم، روی، سولفات و منگنز در محیط کشت DKW تغییر یافته را نسبت به محیط کشت MT، MS و WPM نشان می‌دهد که این موضوع با توجه به نقش حیاتی این یون‌ها در متابولیسم و رشد گیاه به برتری این محیط منجر گردیده است. در این آزمایش اختلاف معنی‌داری از لحاظ درصد جوانه‌زنی، رشد شاخه‌ها و ریشه‌ها در دو نوع محیط کشت DKW و MT مشاهده شد، بطوریکه رشد ریشه‌ها و شاخه‌ها به ترتیب در محیط کشت MT و DKW بیشتر بود (جدول ۲). این نتایج حاصله با نتایج گزارش شده توسط درایور و کونیوکی (۸) مطابقت دارد بطوریکه آنها گزارش کردند برای ریزازدیادی گردو محیط کشت DKW بهتر از محیط کشت WPM و MS است. هیله سادهولت و همکاران (۱۷) گزارش کردند که رشد شاخه‌های جانبی به طور معنی‌داری در محیط کشت DKW بیشتر از محیط کشت WPM است و ریز شاخه‌هایی که در محیط کشت DKW رشد کردند نسبت به آنهایی که در محیط کشت WPM رشد کردند ضخیم‌تر بوده و برگ‌های توسعه یافته و سبزتری داشتند. رشد بیشتر ریشه‌ها در محیط کشت MT ممکن است به خاطر حضور مقادیر زیادی از ویتامین‌های تیامین؛ پیریدوکسین و نیکوتین آمید در این محیط کشت باشد که مقدار آنها چندین برابر بیشتر از محیط کشت DKW تغییر

1- Murashige and Skooge medium (33).
2- Duncan's multiple range test

یافته است؛ به طوریکه این مواد می‌توانند اثرات مختلفی روی فرایندهای بیولوژیکی و سلولی گیاه داشته باشند.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس داده های حاصل از جنین‌های بالغ کشت شده در این ویترو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		جوانه زنی (درصد)	طول ریشه اصلی (سانتیمتر)	طول شاخه اصلی (سانتیمتر)
تکرار	۳	۳۰۸/۲۷^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}	۰/۰۱^{ns}
محیط‌های کشت	۱	۸۰۶/۹۱ **	۰/۱**	۰/۱۱ **
اسید جیبرلیک	۱	۱۹۷۱/۷۶ **	۰/۲۱ **	۰/۲۴ **
شرایط فیزیکی	۱	۶۸۸/۸۵ *	۰/۱۱ **	۰/۱۳ *
اثر متقابل محیط کشت در اسید جیبرلیک	۱	۱۳۹/۴^{ns}	۰/۰۶ *	۰/۰۱*
اثر متقابل محیط کشت در شرایط فیزیکی	۱	۱۴۱/۰۷^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۱^{ns}
اثر متقابل اسید جیبرلیک در شرایط فیزیکی	۱	۵۱۲/۲۴ *	۰/۰۱ *	۰/۰۷ *
اثر متقابل محیط کشت در اسید جیبرلیک در شرایط فیزیکی	۱	۱۰۵/۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}
خطای آزمایشی	۲۱	۳۵/۲۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵
C.V%	–	۲۰	۴/۹۴	۵/۵۷

*و ** به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و علامت ns نشان دهنده غیر معنی دار بودن است.

ماپلی و همکاران (۲۴) گزارش کردند که در حدود ۲۶ درصد از اسید آمینه‌های آزاد در گیاهچه‌های یکساله گردو در ریشه اصلی وجود دارد. همچنین آمینو اسیدهای آزاد ریشه اصلی مشابه آمینو اسیدهای آزاد محور جنینی است. آنها گزارش کردند که سیترولین نقش مهمی را در انتقال آمینو اسیدهای آزاد و همچنین انتقال مجدد نیتروژن ذخیره شده در هنگام جوانه‌زنی گردو ایفا می‌کند. این آمینو اسید غیر پروتئینی در مدت جوانه‌زنی از ارنی‌تین سنتز می‌گردد. مقادیر زیاد ویتامین‌های موجود در محیط کشت MT ممکن است از طریق شرکت در واکنش‌های دکربوکسیلاسیون اسیدهای آلفا ستونی، ترانس آمیناسیون، واکنش‌های اکسیداسیون و احیا و غیره در چرخه‌های مختلف زیستی باعث افزایش سنتز سیترولین و اسید آمینه‌های آزاد در ریشه اصلی گیاهچه‌های گردو گردد و در نتیجه باعث افزایش رشد ریشه‌ها گردد.

جوانه‌زنی جنین‌ها در محیط کشت DKW تغییر یافته بیشتر از محیط کشت MT بوده است که این امر ممکن است ناشی از غلظت زیاد عناصر غذایی در محیط کشت DKW نسبت به محیط کشت MT باشد، بطوریکه این نتایج با نتایج گزارش شده توسط سعادت و هنرتی (۴۹) و امام (۱۰) مطابقت دارد. آنها گزارش کردند که گردو برای رشد در شرایط درون شیشه‌ای به محیط کشتی با عناصر معدنی نسبتا غنی نیاز دارد بطوریکه محیط کشت DKW به عنوان یک محیط کشت غنی از عناصر غذایی است و رشد شاخه‌ها در این محیط کشت بیشتر از محیط‌های کشت دیگر بود. همچنین سعادت و هنرتی (۴۹) همبستگی مثبت و معنی‌داری را بین وزن تر کالوس و وزن تر شاخه؛ وزن تر شاخه و طول شاخه اصلی و همچنین وزن تر کالوس و طول شاخه اصلی در ریز نمونه‌های شاخه انتهای گردوی ایرانی کشت شده در محیط کشت DKW و MS نسبت به محیط کشت WPM مشاهده کردند.

جدول ۲- تاثیر محیط‌های کشت، هورمون اسید جیبرلیک و موقعیت‌های کشت بر رشد شاخه‌ها، ریشه‌ها و جوانه‌زنی جنین‌ها

تیمارها		جوانه‌زنی (درصد)	طول شاخه (سانتیمتر)	طول ریشه (سانتیمتر)
محیط‌های کشت	DKW	۵۸/۷a	۱/۳۴a	۱/۳b
	MT	۴۱/۶b	۱/۲۲b	۱/۴۱a
اسید جیبرلیک	شاهد	۳۸/۸۳b	۱/۱۹b	۱/۴۴a
	۲ (میلی‌گرم بر لیتر)	۵۴/۵۳a	۱/۳۷a	۱/۲۷b
موقعیت‌های کشت	تاریکی/سرما	۵۱/۳۲a	۱/۳۴a	۱/۴۱a
	روشنایی/گرما	۴۲/۰۴b	۱/۲۱b	۱/۳b

میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

شکل ۱- جوانه‌زنی جنین‌های بالغ و گیاهچه‌های حاصله از آنها

a: جنین‌های جوانه زده گردو در تیمار سرمایی در محیط کشت DKW که با ۲ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید تهیه شده است (عکس ۱۲ روز بعد از کشت). b: گیاهچه‌های رشد کرده در تیمار سرمایی در محیط کشت DKW که با ۲ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید تهیه شده است (عکس ۲۱ روز پس از کشت). c: اندازه طول ریشه و شاخه‌های گردو رشد کرده در محیط کشت DKW تهیه شده با ۲ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید در تیمار سرمایی (عکس ۴۰ روز پس از کشت). d: گیاهچه‌های رشد کرده در تیمار سرمایی در محیط کشت MT که با ۲ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید تهیه شده است (عکس ۲۱ روز پس از کشت).

آنها گزارش کردند که وزن تر کالوس تولید شده در سه نوع محیط کشت DKW، MS و WPM اختلاف معنی‌داری نداشته است و این نشان دهنده این موضوع است که تشکیل و رشد کالوس به غلظت‌های یونی وابستگی ندارد. سانچز زامورا و همکاران (۵۱) ۸۱ درصد جوانه‌زنی جنین‌های بالغ *J. regia* را با استفاده از محیط کشت WPM که بدون تنظیم کننده‌های رشد بود گزارش کردند. هورمون جیبرلیک اسید در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش درصد جوانه‌زنی جنین‌ها شد (در سطح احتمال ۱ درصد). علاوه بر این کاربرد ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون جیبرلیک اسید باعث افزایش رشد شاخساره‌ها شده و طویلترین طول شاخه اصلی نیز در این تیمار هورمونی به دست آمد. در این مطالعه هورمون جیبرلیک اسید اثر منفی بر روی توسعه ریشه‌ها گذاشت (در سطح احتمال ۱٪) بطوریکه طویلترین طول ریشه در تیمار شاهد به دست آمد (جدول ۲). مرکل و همکاران (۳۱) گزارش کردند که برای جوانه‌زنی جنین‌ها و توانایی تبدیل آنها به گیاهان کامل فاکتورهای زیادی دخالت می‌کنند. راجاسکاران و همکاران (۴۲) و فینکلستین و همکاران (۱۱) گزارش کردند که ABA در طول مدت بلوغ جنین‌ها تجمع می‌یابد به طوریکه تجمع ABA باعث القای کمون جنین‌ها می‌گردد. بطور کلی GA_3 و پیش سازهای GA در دوره چینه سرمایی افزایش می‌یابد، بطوریکه در این دوره سطوح ABA کاهش شدیدی پیدا می‌کند. علاوه بر این کاربرد GA_3 جوانه‌زنی جنین‌ها را القا می‌کند.

اسید جیبرلیک جوانه‌زنی جنین‌ها را به وسیله القای تولید آنزیم‌های هیدرولیتیکی و انعطاف پذیری سلول‌ها تسریع می‌کند (۱۱ و ۴۸). جیبرلین‌ها ممکن است با تغییر توزیع کلسیم در بافت رشد را القا کنند. کلسیم به عنوان یک عامل کاهش دهنده قابلیت توسعه دیواره سلولی در دولپه‌ای‌ها شناخته شده است، در نتیجه ممکن است جیبرلین‌ها به نحوی غلظت کلسیم دیواره سلولی را کاهش دهد که این عمل احتمالا با تحریک جذب کلسیم به داخل سلول صورت می‌گیرد (۵۵). همچنین به نظر می‌رسد جیبرلین‌ها در رشد سلول‌های متصل به جنین‌ها خیلی جوان که احتمالا جذب مواد غذایی را برای آن تسهیل می‌کند نقش مهمی ایفا می‌کند. با توجه به اینکه مقدار جیبرلین در بذور رسیده تا سطح صفر کاهش می‌یابد (۱۱)، نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که در کشت جنین‌های بالغ گردو کاربرد جیبرلین ضروری است. بطور کلی جیبرلین‌ها در دو مرحله بر روی جوانه‌زنی نقش مهمی ایفا می‌کند. در مرحله اول تولید آنزیم‌ها هیدرولیزی را از طریق نسخه برداری کروموزوم افزایش می‌دهند و در مرحله دوم از طریق سیستم متحرک سازی و انتقال مجدد منابع غذایی ذخیره شده عمل می‌کنند (۵۵). کور و همکاران (۱۹) گیاهچه‌های گردو (*J. regia*) را از طریق کشت جنین بالغ در محیط کشت MS که با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین و ۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک تهیه شده بود به دست آوردند. پیغام‌زاده و کاظمی‌تبار (۳۶) گزارش کردند که محیط

کشت DKW که با ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین در ترکیب با ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید تهیه شده بود بهترین محیط برای جوانه‌زنی جنین‌های نابالغ *J. regia* است. امام (۱۰) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف هورمونی و محیط‌های کشت مشاهده کرد. وی گزارش کرده است که برای شاخه‌زایی در گردو محیط کشت DKW و هورمون BAP (۱ میلی‌گرم بر لیتر) مناسب می‌باشد. همچنین رشد جوانه‌ها در محیط کشت MS که حاوی بنزیل آمینو پورین بود نتایج مثبتی را از نظر شاخه‌زایی و رشد قطری و طولی داشته است (۱۰). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که هورمون جیبرلیک اسید در رشد طولی گیاهچه‌ها موثر بوده و باعث افزایش درصد جوانه‌زنی و رشد طولی شاخه‌ها شده است که این نتایج با نتایج گزارش شده توسط امام (۱۰) و مک گراناهان (۲۹) مطابقت دارد. امام (۱۰) گزارش کرده است که کاربرد هورمون جیبرلیک اسید در افزایش رشد طولی شاخه موثر بوده است. بنماهیول و همکاران (۲) گزارش کردند که افزودن ۲/۹ میکرومول اسید جیبرلیک به محیط کشت بر تکثیر شاخه جانبی تاثیری نداشته است و تنها بر روی افزایش طول شاخه به ازای هر ریز نمونه اثر گذاشته است. سانچز زامورا و همکاران (۵۱) گزارش کردند که ریز نمونه‌های گردو (*J. regia*) در حضور ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین بیشترین مقدار تکثیر را حاصل داده است. رویلا و همکاران (۴۵) گزارش کردند که برای ریزازدیادی قطعات جنینی یا مواد گیاهی جوان هورمون‌های بنزیل آمینو پورین (۱ میلی‌گرم بر لیتر)، ایندول بوتیریک اسید (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) مناسبترین هورمون‌ها است. رنوکداز و همکاران (۴۳) گیاهچه‌های پکان (*Carya illinoinensis*) را با کارایی بالایی از طریق کشت جنین در محیط کشت MS که با ۱۸ میکرومول BAP و ۵ میکرو مول IBA تهیه شده بود به دست آوردند. رنوکداز و همکاران (۴۴) همچنین تکثیر حداقل ۹ شاخه به ازای هر ریزنمونه را در محیط کشت WPM تغییر یافته که حاوی ۱۳/۳۲ میکرومول بنزیل آمینو پورین بود را گزارش کردند. نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج گزارش شده توسط پیغام زاده و کاظمی‌تبار (۳۷) مطابقت دارد، بطوریکه آنها گزارش کردند که ۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین جوانه‌زنی جنین‌ها و تکثیر شاخه‌های پکان (*Carya illinoinensis*) را افزایش داده است. همچنین بررسی موقعیت‌های فیزیکی مختلف کشت نشان داد که جوانه‌زنی جنین‌ها نیز تحت تاثیر شرایط مختلف کشت قرار گرفت (جدول ۱)، بطوریکه جوانه‌زنی جنین‌ها در موقعیت کشت تاریکی با تیمار سرمایی ۲±۴ درجه سانتیگراد بیشتر از موقعیت کشت روشنایی با دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد با ۱۶/۵ ساعت دوره نوری بوده است (جدول ۲). همچنین رشد شاخه‌ها و طول شاخه‌ها در موقعیت کشت تاریکی بیشتر از موقعیت کشت روشنایی بود، شاید دلیل این امر در نتیجه اثر القایی تیمار سرمایی بر روی جوانه‌زنی جنین‌ها و جلو افتادن رشد گیاهچه‌ها باشد (جدول ۲). علاوه بر این طویلترین طول ریشه (۱/۴۱ سانتیمتر) در موقعیت کشت تاریکی و تیمار سرمایی به دست آمد (جدول ۲). جوانه زنی جنین‌های گردو تحت شرایط مختلف کشت توسط محققین مختلفی گزارش شده است. یاماچی و همکاران (۵۸) و سان و فرانک (۵۵) گزارش کردند بیان ژن‌های *AtGAox* و ژن بیوسنتزی BA که مستقیما در متابولسیم GA شرکت می‌کنند در بذرهای *Arabidopsis* که به مدت ۴۸ ساعت در سرمای ۴ درجه سانتیگرادی قرار داشتند افزایش یافته است. لیو و هان (۲۳) رشد طولی محور جنینی جنین‌های بالغ گردو را که به مدت ۱ تا ۲ هفته در تیمار سرمایی قرار داشتند را گزارش کردند. آنها گزارش کردند که تیمار حرارتی پایین ۲ تا ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ تا ۱۰ هفته برای غلبه کردن بر رکود جوانه‌های انتهایی جنین‌های بالغ گردو ضروری است. پیغام زاده و کاظمی تبار (۳۷) و کور و همکاران (۱۹) گزارش کردند که بیشترین درصد جوانه‌زنی و طول شاخه اصلی در تیمار سرما حاصل شده است. زارعی خاجه کلایی و همکاران (۵۹) یافتند که فعالیت آرژیناز در تیمار سرمایی تا حدود دو برابر افزایش می یابد. آنها گزارش کردند که کاهش مقدار جوانه‌زنی در گردو در شرایط گرمایی اساسا با غیر فعال شدن سریع آرژیناز، مقادیر زیاد آمونیاک و تغییر ترکیبات پلی آمین‌های مغز گردو در ارتباط است. افزایش فعالیت گلوتامین دهیدروژناز در تیمار گرمایی با آمین‌زدایی کاتابولیکی اسیدهای آمینه و در ادامه سوختن آنها در مسیرهای متابولیکی همراه است.

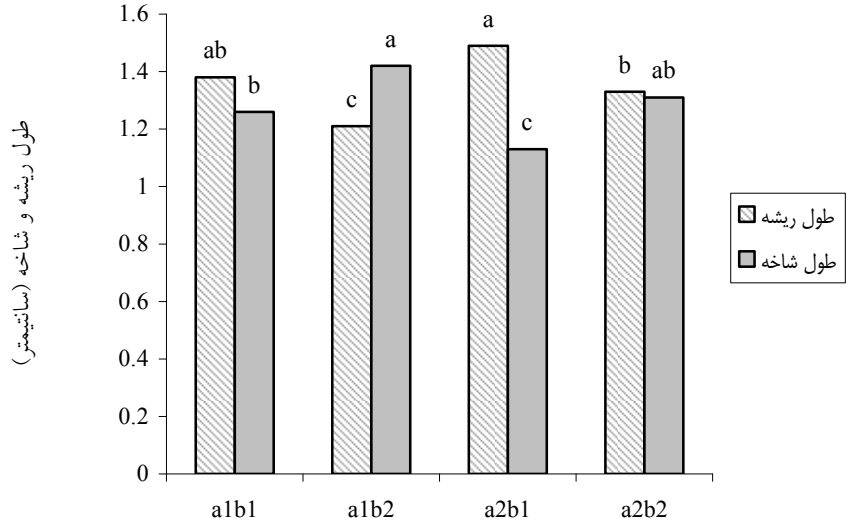
جدول ۳- اثر متقابل اسید جیبرلیک و موقعیت‌های مختلف کشت بر جوانه‌زنی جنین و رشد شاخه‌ها و ریشه‌های اصلی گردوی ایرانی

تیمارها	جوانه زنی (درصد)	طول شاخه اصلی (سانتیمتر)	طول ریشه اصلی (سانتیمتر)
اسید جیبرلیک (شاهد) × تاریکی/ سرما	۳۹/۴۷b	۱/۲۶b	۱/۴۹a
اسید جیبرلیک (شاهد) × روشنایی/گرما	۳۸/۱۹b	۱/۱۲c	۱/۳۹b
اسید جیبرلیک (۲ میلی‌گرم بر لیتر) × تاریکی/ سرما	۶۳/۱۷a	۱/۴۲a	۱/۳۴b
اسید جیبرلیک (۲ میلی‌گرم بر لیتر) × روشنایی/گرما	۴۵/۸۹b	۱/۳۱b	۱/۲۱c

میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

این موارد نشان می‌دهد که متابولسیم اختصاصی آمینو اسیدها در هنگام جوانه‌زنی در حرارت‌های پایین در مدت چینه سرمایی و با افزایش فعالیت آرژیناز بطور بهتری انجام می‌گردد (۵۹). آرژیناز یکی از آنزیم‌های چرخه اوره است که باعث تبدیل آرژنین به اوره و ارنی‌تین می‌گردد. ارنی‌تین پیش ماده سیترولین است و این اسید آمینه غیر پروتئینی به انتقال اسید آمینه‌های آزاد و انتقال مجدد نیتروژن ذخیره شده در هنگام جوانه‌زنی گردو کمک می‌کند و باعث افزایش درصد جوانه‌زنی جنین‌های گردو می‌گردد (۲۴).

در این آزمایش اثر متقابل هورمون جیبرلیک اسید و موقعیت‌های مختلف کشت نیز در سطح احتمال ۵درصد بر روی جوانه‌زنی جنین‌های کشت شده اثر گذاشته است (جدول ۱)، به طوریکه با به کار بردن ۲ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید در موقعیت کشت تاریکی با تیمار سرمایی ۲±۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از تیمارهای دیگر بود. به طور کلی درصد جوانه‌زنی جنین‌های گردو هنگامی که هورمون جیبرلیک اسید و موقعیت کشت تاریکی همراه با تیمار سرمایی به طور همزمان به کار برده شدند، نسبت به هنگامی که این دو فاکتور به طور جدا مورد استفاده قرار گرفت بیشتر بود (جدول ۳؛ شکل ۱). این نتایج با نتایج گزارش شده توسط پیغام زاده و کاظمی تبار (۳۷) و کور و همکاران (۱۹) مطابقت دارد، بطوریکه آنها گزارش کردند که جوانه‌زنی جنین‌های گردو (*J. regia*) هنگامی که هورمون GA_3 (۲ میلی‌گرم بر لیتر) و تیمار سرمایی به طور همزمان بکار برده شدند بیشتر از هنگامی بود که این دو فاکتور به طور جداگانه استفاده شدند. اثر متقابل بین هورمون جیبرلیک اسید و موقعیت‌های مختلف کشت نیز در سطح احتمال ۵درصد رشد شاخه‌ها را تحت تاثیر قرار داد (جدول ۱)، بطوریکه کاربرد ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون جیبرلیک اسید در موقعیت کشت تاریکی با تیمار سرمایی بیشترین تاثیر را بر رشد شاخه‌ها داشت و طویلترین طول شاخه اصلی در این تیمار به دست آمده است (جدول ۳). عکس العمل متقابل هورمون اسید جیبرلیک و شرایط فیزیکی کشت بر روی رشد ریشه‌ها اثر گذاشته است (در سطح احتمال ۵درصد) بطوریکه ریشه‌های گیاهچه‌هایی که در تیمار سرمایی و بدون هورمون جیبرلیک اسید رشد می‌کردند بیشترین طول ریشه را داشتند (جدول ۳). عکس العمل متقابل بین نوع محیط کشت و هورمون جیبرلیک اسید نیز در سطح احتمال ۵درصد بر رشد ریشه‌ها و شاخه‌ها اثر گذاشت. طویلترین ریشه اصلی در محیط کشت MT که بدون هورمون جیبرلیک اسید بود حاصل شد. بگونه‌ای که این تیمار با محیط کشت DKW که بدون هورمون اسید جیبرلیک بود اختلاف معنی‌داری نداشت. از طرفی طویلترین طول شاخه اصلی در محیط کشت DKW که دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک بود به دست آمد بطوریکه این تیمار با محیط کشت MT که دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک بود اختلاف معنی‌داری نداشت (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر متقابل محیط‌های کشت و هورمون اسید جیبرلیک بر رشد و توسعه ریشه‌ها و شاخه‌ها

a1 و a2 به ترتیب نشان دهنده محیط کشت DKW تغییر یافته و MT می‌باشد. حروف b1 و b2 به ترتیب نشان دهنده صفر میلی‌گرم و ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون اسید جیبرلیک می‌باشد. میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (بر اساس آزمون دانکن).

گیاهان سازگار شده ریشه‌های کلفت و شاخه‌های شادابی را تولید کردند سان و هاتیک (۵۰) بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی پسابیده شده (خشک شده تحت تیمارهای شیمیایی) حاصل از بذرهای دگرگرده افشان ژنوتیپ Bilecik را در محیط کشت DKW که حاوی ۸/۶ میکرومول اسید جیبرلیک بود یا به وسیله قرار دادن آنها به مدت چهار هفته در تیمار سرمایی ۴ درجه سانتیگراد به دست آوردند. فینکلستین و همکاران (۱۱)، راجاسکان و همکاران (۴۲) و سان و فرانک (۵۵) گزارش کردند که جوانه‌زنی جنین ها بدون تیمار سرمایی یا بدون کاربرد هورمون GA_3 با کارایی پایینی انجام می‌شود. تیمار سرمایی یا GA_3 سطح ABA را کاهش می‌دهد و در نتیجه جوانه‌زنی جنین‌ها را افزایش می‌دهد (۱۱ و ۵۵). پیش سرمادهی و در ادامه قرار دادن جنین‌ها در برابر نور، جوانه‌زنی و رشد شاخه‌ها را افزایش داده است. این فرایند ممکن است در نتیجه شکستن خواب جنین در تیمار سرمایی و در ادامه جذب نور قرمز و نهایتا افزایش مقدار نسخه برداری ژن‌های تولید کننده GA باشد (۵۸). همچنین یاماچی و همکاران (۵۸) پیشنهاد کردند که نور و تیمار سرمایی ممکن است اثرات مضاعفی بر روی جوانه‌زنی داشته باشند، بطوریکه حرارت فاکتور مهمی در فعالیت ژن‌هایی که در سنتز GA در ارتباط هستند می‌باشد.

منابع

1- Beineke W.F. 1983. The genetic improvement of black walnut for timber production. Plant Breeding Reviews. 1: 236-266.
2- Benmahioul B., Meriem K.H., Noelle D., and Florence D. 2009. In vitro embryo germination and proliferation of Pistachio (*Pistacia vera* L.). Scientia Horticulturae. 122 (3): 479-483.
3- Bridgen M.P. 1994. A review of plant embryo culture. Horticultural Science. 29: 1243–1246.
4- Brinkman K.A. 1974. Juglans L. Walnut. In: Schopmeyer CS (tech coord) Seeds of woody plants in the United States. USDA For Serv, Agric Handbook No 450, Washington, pp: 454-459.
5- Chenevard D., Frossard J.S., and Jay -Allemand C. 1997. Carbohydrate reserves and CO2 balance of Hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23X *Juglans regia*) Plantlets during acclimatisation. Scientia Horticulturae. 68: 207-217.
6- Claudet A.C., Drauet A., and Jay-Allemand C. 1992. Tissue distribution of phenolic compounds in annual shoots from adult and rejuvenated hybrid walnut trees. Plant Physiology and Biochemistry. 30 (5): 565-572.
7- Cornu D., and Jay-Allemand C. 1989. Micropropagation of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* × *Juglans regia*) through culture and multiplication of embryos. Annual Science of Forest. 46:113s -116s.
8- Driver J.A., and Kuniyuki A.H. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. Horticultural Science. 19: 507- 509.
9- Elias T.S. 1980. The complete trees of North America.-New York: Van Nostrand Reinhold.
10- Emam M. 2004. Asexual regeneration of mature Juglans regia by shoot tip culture. Pajouhesh and Sazandegi. 63: 10-15.
11- Finkelstein R., Wendy R., Tohru A., and Camille S. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. Annual Review of Plant Biology. 59: 387-415.
12- Funk D.T. 1979. Genetics of black walnut. In: Jaynes, R. A., (Ed.). Nut tree culture in North America, Hamdem, CT: North. Nut Growers Association. pp. 51- 73.
13- 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.
14- Gruselle R., and Boxus P. 1990. Walnut micropropagation. Acta Horticulturae. 284, 45–52.
15- Gruselle R., Badia N., and Boxus P. 1987. Walnut micropropagation: first results. Acta Horticulturae. 212: 511–516.
16- Guatam D.R., and Chauhan J.S. 1990. A Physiological analysis of rooting in cuttings of juvenile walnut (*J. regia* L.). Acta Horticulturae. 284: 33-43.
17- Heile-Sudholt C., Huetteman C.A. Preece J.E., Van Sambeek 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.
18- Hormaza J.I. 1999. Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. Scientia Horticulturae. 79: 121–126.
19- Kaur R., Sharma N., Kumar K., Sharma D.R., and Sharma S.D. 2006. In vitro germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. Scientia Horticulturae. 109: 385-388.
20- Lakes C., and Zimmerman R.H. 1990. Impact of osmotic potential on in vitro culture of apple. Acta Horticulturae. 280: 417– 24.
21- Land S.B., and Cunningham M. 1994. Rooted cutting macropropagation of hardwoods. *In*: Applications of vegetative propagation in forestry. Proc. of the Southern regional information exchange group biennial symposium

on forest genetics. Foster, G. S. and A. M. Diner. Published by Southern Forest Experiment Station New Orleans, Louisiana. pp: 75-96.
22- Leslie C., and McGranahan G. 1992. Micropropagation of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *In*: Bajaj, Y. P. S. Biotechnology in agriculture and forestry, vol 18. High-tech and micropropagation I 1. Springer, Berlin Heidelberg New York. pp: 136-150.
23- Liu S.L., and Han B.W. 1989. Plant regeneration from excised embryos of *Juglans regia*. Acta Phytophysiologica Sinica. 15: 98–100.
24- Mapelli S., Bram Billa I., and Bertani A. 2001. Free amino acids in walnut kernels and young seedlings. Tree Physiology. 21: 1299-1302.
25- McDaniel J.C. 1979. Other walnut including butternut, heartnut, and hybrids.- *In*: Jaynes, R. A., (Ed.). Nut tree culture in North America, pp.98-110.- Hamdem, CT: North. Nut Growers Assoc.
26- McGranahan G., and Leslie C.A. 1987. In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. Horticultural Science. 23 (1): 220.
27- McGranahan G., and Leslie C. 1990. Walnuts (*Juglans*). *In*: Moore, J. N., Ballington, J R. Geneticresources of temperate fruit and nut crops, vo l2. Int Soc Hortic Sci, Wageningen. pp: 907 – 951.
28- McGranahan G.H., Leslie C.A., Uratsu S.L., Martin L.A., and Dandekar A.M. 1988. Agrobacterium-mediated transformation of walnut somatic-embryos and regeneration of transformed plants. Bio/Technology. 6: 800-804.
29- McGranahan G. 1987. Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga and Durzan (edt).Cell and tissue culture in Forestry, Vol G.H, 3. Martinus.Nijhoff (pub): 261-271.
30- McGranahan G., Leslie C.A., and Driver J.A. 1988. In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. Horticultural Science. 23 (1): 220.
31- Merkle S.A., Parrott W.A., and Flinn B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. *In*: Thorpe, T.A., ed. In vitro embryogenesis in plants (Current plant science and biotechnology in agriculture, vol. 20). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp: 155–203.
32- Mott R.L. 1981. Trees. In: Conger, B. V. (ed) Cloning Agricultural Plants via *in vitro* Technique, pp: 217–254. Boca Ratón, Fla: CRS.
33- Murashige T., and Skooge F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology.. 15: 473-479.
34- Murashinge T., and Tucker D.P.H. 1969. Growth factors requirements of citrus tissue culture. [1] International Citrus Symposium. 3: 1155-1161.
35- Orchard L.P. 1984. Butternut canker: host range, disease resistance, seedling-disease reactions, and seed-borne transmission. PhD Diss, University of Wisconsin, Madison. Pp: 145.
36- Payghamzadeh K., and Kazemitabar S.K. 2010a. The effects of BAP and IBA and genotypes on in vitro germination of immature walnut embryos. International Journal of Plant Production. 4 (4), Pp: 309-322.
37- Payghamzadeh K., and Kazemitabar S.K. 2010b. In vitro germination of Pecan (*Carya illinoinensis*) embryo. Biharean Biologist. 4 (1): 37-43.
38- Penuela R., Garavito C., Sanchez-Tames R., and Rodrıguez R. 1988. Mutiple shoot-bud stimulation and rhizogenesis induction of embryogenic and juvenile explants of walnut. Acta Horticulturae. 227: 457-459.
39- Preece J.E., van Sambeek J.W., Huetteman C.A., and Gaffney G.R. 1989. In vitro studies with walnut (*Juglans*) species. In: Phelps JE (ed) The Continuing Quest for Quality, pp 159–180. Proceed 4th Black Walnut Symposium. Carbondale, Illinois.
40- Raghavan V. 1977. Applied aspects of embryo culture. In: Reinert J and Bajaj YPS (eds) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue Culture, pp 375–397. Berlin- Heidelberg-New York: Springer-Verlag.
41- Raghavan V. 1980. Embryo culture. In: Vasil IK (ed) International review of cytology supplement 11B. Perspectives in Plant cell, tissue and organ culture, pp 209–240. New York: Academic Press.
42- Rajasekaran K., Vine J. and Mullins M.G. 1982. Dormancy in somatic embryos and seeds of *Vitis*: changes in endogenous abscisic acid during embryogeny and germination. Planta. 154: 139–144.
43- Renukdas N.N., Manoharan M., and Garner J.O. 2008. in vitro plant regeneration of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant. 44: 342-363.
44- Renukdas N.N., Manoharan M., and Garner J.O. 2009. In vitro propagation of pecan (*Carya illinoinensis* (Wangenh) K. Koch. ARD 15th Biennial Research Symposium, Atlanta, Georgia (P181).
45- Revilla M.A., Majada J., and Rodriguez R. 1989. Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. Forest Tree Physiology. 46: 149-151.
46- 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 Horticulturae. 311: 141–152.
47- Rodriguez R., Revilla A., Albuerne M., and Perez C. 1989. Walnut (*Juglans spp*). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 5 Trees II. Springer, Berlin Heidelberg New York. Pp: 99-126.
48- Rout J.R., Ritarani D., Arati B.P., and Santi L.S. 2009. Effects of scarification, cold stratification and giberellic acid treatments on germination of Elephantopus scaber L. seeds. American-Eurasian Journal of Agriculture and

Science. 4 (4): 689-691.
49- Saadata Y.A., and Hennerty M.J. 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Scientia Horticulturae. 95, 251–260.
50- San B., and Hatic D. 2007. Effect of desiccation, cold storage and gibberellic acid on germination of somatic embryos in walnut (*Juglans regia* L). New Zealand journal of crop and horticultural science. 35 (1): 73-78.
51- Sanchez-Zamora M.A., Diego Frutos Tomas J.C.T., and Garcia-Lopez R. 2006. Embryo germination and proliferation in vitro of *Juglans regia* L. Scientia Horticulturae. 108 (3): 317-321.
52- SAS Institute. 1997. SAS/STAT users guid. Version, 6.12., SAS Inst. Cary. NC.
53- Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panetsos, K.P., and Moulalis, D., 1997. Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia* L.). Silvae Genetica. 46 (6): 326-332.
54- Şen S.M. 1986. Walnut Growing. Eser Matbası, 229 p.
55- Sun T.P., and Frank G. 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annual Review of Plant Biology. 55: 197-223.
56- Vahdati K., Bayat S., Ebrahimzadeh H., Jariteh M., and Mirmasoumi M. 2008. Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in persion walnut (*Juglans regia* L.). Plant cell, tissue and organ culture. 93: 163-171.
57- Yalcin I. 1993a. *Juglans regia* L. sürgün çeliklerinin kök olusturmasında anatomik engeller ve kök olusumu üzerine bir arastırma. C.Ü. Fen Bil. Der. 15 (16): 63-80.
58- Yamauchi Y., Ogawa M., Kuwahara A., Hanada A., Kamiya Y., and Yamaguchi S. 2004. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. The Plant Cell. 16:367–378
59- Zarei-Ghadikolaee M., Abdolzadeh A., and Sadeghipour H.R. 2010. Arginase, glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase activity in moist chilled and warm incubated walnut kernels. Trees-structure and function. 24 (3): 425-433.