پژوهش‌های علوم کشاورزی پایدار/جلد ٤/شماره ١/ ١٤٠٣/ ص ٣٧-٢٥
https://www.sarj.iauk.ac.ir

بررسی اثر تنظیم¬کننده¬های رشد بر کالوس¬زایی و جنین زایی رویشی گردو رقم پکان (Carya illinoensis) در شرایط درون شیشه¬ای

محمد دلی[1]، محمد معتمدی*[2] و شهاب سادات جعفری[3]

١-دانش آموخته گروه تولید و ژنتیک گیاهی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

٢-استادیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

٣-استادیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: Motamedi555@gmail.com

(تاریخ دریافت: ١٤٠٢/١٢/١١- تاریخ پذیرش:١٤٠٣/١/١٥)

چکیده

گردوی پکان (Carya illinoensis) گیاهی با ارزش اقتصادی بالا است. استفاده از تکنیک های ریزازدیادی در تکثیر رویشی ارقام و ژنوتیپ¬های برتر یکنواخت گردو بسیار موثر خواهد بود. به منظور بهینه¬سازی کشت بافت گردو، در این پژوهش سرشاخه¬های تازه درخت گردو رقم پکان جداسازی و به آزمایشگاه انتقال یافتند. جهت سترون-سازی، کالوس¬زایی و جنین¬زایی بدنی سه آزمایش با اعمال تیمارهای مختلف انجام شد. شش تیمار سترون سازی در یک طرح کاملا تصادفی با ٤ تکرار برای این تحقیق در نظر گرفته شد. جهت دستیابی به کالوس محیط کشت DKW به عنوان محیط کشت پایه در نظر گرفته شد. ٨ تیمار کالوس¬زایی در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ٤ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. جهت دستیابی به جنین¬زایی سوماتیکی غیر مستقیم، ترکیبات متفاوتی از TDZو نیز NAA در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده¬های سترون¬سازی دال بر وجود اختلاف معنی¬دار بین تیمارهای مذکور بود. نتایج اعمال تیمارهای سترون¬سازی، هیپوکلریت سدیم ٢٠٪ به مدت ٥ دقیقه همراه با الکل ٧٠٪ به مدت ١٥ ثانیه را به عنوان بهترین نتیجه برای سترون سازی ریزنمونه¬ها معرفی نمود. محیط کشت DKW که با ٣ میلی گرم در لیتر D-٢،٤ و ٠/٥ میلی گرم در لیتر NAA تکمیل شده بود بهترین نتیجه را در کالوس زایی به همراه داشت. TDZ در مقدار ٦ میکرومولار به همراه NAA میزان٠/٢ میکرومولار بهترین نتیجه را در جنین¬زایی کالوس¬های حاصل به همراه داشتند.

واژه‌های کلیدی: گردوی آمریکایی، جنین زایی، کالوس، کشت بافت

مقدمه

گردوهایی که در نقاط گردو خیز ایران کاشته شده‌اند از گونه گردوی معمولی یا *Juglans* هستند. پکان یا "گردوی آمریکایی" با نام علمی *Carya illinoensis* به خانواده *Juglandaceae* تعلق داشته و بومی آمریکای مرکزی می‌باشد و از بهترین انواع گردو برای مناطق گرمسیری است که در مناطق گرم و با رطوبت بالا رشد می‌کند. در برخی از ارقام پکان، میزان اسید اولئیک بیش از دو برابر گردوی معمولی بوده و به بیش از ۷۵ درصد می-رسد. ایران پس از چین و آمریکا رتبه سوم سطح زیر کشت و تولید گردو را در جهان داراست (FAOSTAT, 2014). میزان تولید گردو در کشور بالغ بر ۲٦۵ هزار تن و سطح زیر کشت ۱۷۰ هزار هکتار می‌باشد (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۹).

علی‌رغم اهمیت اقتصادی گردو، متاسفانه روشهای مطلوب تکثیر توسعه نیافته‌اند و محصول گردو در کشور غیریکنواخت می‌باشد که این امر از دلایل سهم کمتر در صادرات این محصول است. گردو گیاهی سخت ریشه زا است و تکثیر واریته-های مختلف آن از طریق روشهای متداول غیرجنسی مشکل است. ازدیاد به روش جنسی با مشکلاتی نظیر تفرق صفات، حصول تعداد کم گیاه سالم و همچنین تنوع بالای نتاج مواجه است. در روشهای معمول تکثیر رویشی نیز بیماریهای میکروبی به راحتی می‌توانند از نسلی به نسل دیگر منتقل شوند، بنابراین استفاده از روشهای کشت بافت و ریزازدیادی برای تولید انبوه واریته‌های سالم و نیز با بنیه بالای گردو که از لحاظ مورفولوژیک و ژنتیکی یکنواخت باشند ضروری می‌باشد (Bagheri *et al.*, 2009).

کشت بافت گیاهی نقش اساسی در بهبود ژنتیکی گیاهانی دارد که به روش غیرجنسی تکثیر می یابند. جنین زایی از تکنیک‌های ریزازدیادی است که کشت یکنواخت و حذف مشکلات ریشه زایی توسط تولید ریشه و ساقه از جنین را ممکن می‌سازد (Tahami *et al.*, 2016).

در میان محیط‌های کشت پایه برای گیاه گردو محیط کشت MS ساده و نیز DKW متداول‌ترین محیط‌های کشت می‌باشند. گردوی ایرانی نیاز به محیط کشت غذایی با نمک‌های بالا دارد و محیط کشت DKW از این لحاظ مناسب است. این محیط کشت در میزان نیتروژن شبیه محیط کشت MS بوده ولی در بعضی از اجزا از محیط کشت MS قوی‌تر است (Sadata & Hennerty 2002; Payghamzade & Kazemi Tabar, 2010).

تحقیقاتی در خصوص ریزازدیادی گردوی ایرانی انجام شده است. کالوس زایی، تمایز و ریزازدیادی گردوی ایرانی (*Juglans regia L*.) را مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند که در محیط کشت WPM همراه با کاربرد هورمون ایندول-۳-بوتیریک اسید (IBA) باززایی ریشه ۷۰ و باززایی یا تمایز ساقه ٦۰ درصد و بدون استفاده از هورمون کمتر از ۵۰ درصد برای ریشه و ساقه بود و نتایج این تحقیق مشخص کرد که استفاده از هورمون IBA جهت بهبود ریزازدیادی جنین گردو مناسب می‌باشد (Mostafavi *et al.*, 2009).

در بررسی تأثیر نوع محیط کشت بر پرآوری گردو در کشت درون شیشه‌ای برای تولید کالوس از

محیط MS با غلظت های ۳ ، ٦ و ۹ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ٤ میلی‌گرم در لیترIBA استفاده شد که بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به٦ میلی گرم در لیتر BAP همراه با ٤ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (Hajhasani *et al.*, 2018).

محققان در ارتباط با جنین‌زایی و بدست آوردن کالوس از گیاه گردو تفاوت معنی دار سطوح مختلف BA و NAA را گزارش کردند. در محیط کشت DKW حاوی ۵/۲ میلی گرم بر لیتر به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر BA و محیط کشت DKW حاوی ۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر به تنهایی و در محیط کشت DKW حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین ترکیب تیماری برای کالوس‌زایی بود (Tahami *et al.*, 2016). **در** تحقیقی با بررسی ریشه‌زایی گردوی محلی کاغذی نشان دادند که تیمار IBA در روش قلمه‌زنی نقش موثری در ظهور اولین پریموردیوم ریشه داشت، ولی تیمار 2,4-D روی ظهور اولین پریموردیوم ریشه، تاثیر چندانی از خود نشان نداد. همچنین تیمارهای 2,4-D و IBA هر دو موجب افزایش طول ریشه چه و افزایش درصد بقای قلمه‌های ریشه‌دار شده گردیدند (Zaker Bostan Abad *et al.*, 2012).

در بررسی تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی گیاه دارویی *Myrtus communis* L. محیط کشت DKW را محرک تولید بیشترین ریشه اصلی و فرعی دانستند که امکان دستیابی به مناسبترین روش ریزازدیادی را فراهم می‌سازد (Mirjani & Emam, 2021). بررسی تاثیر ریزنمونه و سطوح مختلف هورمون-های NAA و 2,4_D جهت القای کالوس در گیاه سویا نشان دادند که بیشترین درصد کالوس‌زایی در کمترین زمان ممکن مربوط به محیط کشت حاوی ٤ میلی گرم در لیتر هورمون NAA و ٤ میلی گرم در لیتر هورمون 2,4_D بوده است (Nejati Saravi et *al.*, 2018). در پژوهشی ترکیبی از سه هورمون BA، Kin و نیز GA_3 را برای جنین‌زایی در گردو پیشنهاد داده اند (Kaur *et al.*, 2006). در بررسی دو ژنوتیپ گردو (Z_{60} و Z_{63}) روی محیط کشت پرآوری (DKW دارای ٦/۰ میلی‌گرم در لیترهورمون BA) که دارای ٦-۵ سانتی متر طول بودند از دو محیط کشت پایه MS و DKW هر کدام با ۱/۴ غلظت عناصر برای ریشه‌زایی استفاده شد. این محیط‌ها همراه با هورمون NAA در چهار غلظت (۱ و ۲ و ۳ و ٤) میلی‌گرم در لیتر همراه با شاهد برای مرحله القای ریشه مورد بررسی قرار گرفت. در محیط DKW با افزایش غلظت میزان ریشه‌زایی ٦ برابر افزایش یافت. حداقل میزان صفات مورد بررسی نیز به تیمار بدون هورمون MS مربوط است که در وزن تر ریشه تفاوت معنی‌داری با DKW ندارد (Yari *et al.*, 2011).

با توجه به کاربردهای وسیع و نیز اهمیت دستیابی به کالوس و جنین‌های رویشی در اصلاح گیاه گردو گونه پکان، این تحقیق با هدف دستیابی به دستورالعمل‌های کالوس‌زایی و نیز جنین‌زایی رویشی این گونه درختی با ترکیب مناسبی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر سرشاخه‌های تازه و ساقه‌های حاوی گره گیاه گردو گرمسیری گونه درختی پکان جدا سازی و به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر انتقال یافتند. قطعات حاوی دمبرگ و نیز میانگره‌ها به عنوان ریزنمونه در نظر گرفته شد. دستیابی به بافت کالوس از ساقه های حاوی گره و نیز دمبرگ‌های جوان می‌تواند به جدید بودن و نوآوری تحقیق بیافزاید.

جهت دستیابی به مناسبترین روش ممکن برای سترون کردن نمونه ها در رقم مورد مطالعه پس از شستشوی ریزنمونه‌ها با آب به مدت نیم ساعت و غوطه وری در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱۵ ثانیه، شش تیمار هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ (در ٦ بازه زمانی ۱، ۳، ۵، ۷، ۹و۱۱ دقیقه) در قالب یک طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار استفاده شد. پس از طی مراحل ضد عفونی ریز نمونه‌ها در محیط کشت DKW (Driver & Kuniyuki, 1984) قرار گرفت و به اتاقک رشد (انکوباتور) در شرایط تاریکی با تهویه مناسب و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند. برای القای کالوس‌زایی در محیط کشت DKW هشت تیمار کالوس‌زایی با غلظت‌های مختلفی از اکسین 2,4-D و NAA در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار استفاده شد (جدول ۱). فاکتور A هورمون 2,4-D با چهار غلظت (۱، ۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور B هورمون NAA در دو غلظت (۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) استفاده شدند. نگهداری کالوس‌ها در شرایط تاریکی تا پایان هفته چهارم صورت گرفت. پس از چهار هفته از کشت، کالوس‌های حاصل در محیط کشت جدید با همان ترکیب قبلی از هورمون‌های رشد کشت داده شدند. باززایی کالوس‌ها هر چهار هفته یکبار انجام شد. تشکیل ترکیبات پلی‌فنولیک در گیاهان چوبی به کرات گزارش گردیده است و در گردو نیز در گزارشات متعدد به راهکارهای موثری پرداخته شده است که یکی از این راهکارها استفاده از زغال فعال است (Ehtesham Nia & Gholami, 2017). بدین منظور ابتدا ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت کالوس حاوی زغال فعال (ساخت شرکت دایجونگ کره جنوبی) انتقال یافتند. پس از ٤ هفته، ریزنمونه ها از محیط کشت زغال فعال مجددا به محیط های کشت کالوس‌زایی ساده انتقال یافتند.

به منظور جنین‌زایی سوماتیکی، ترکیبات متفاوتی از TDZ در سه سطح (۲، ٤ و ٦ میکرومولار) و NAA در دو غلظت (۰/۲ و ۰/۵ میکرومولار) در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ٤ تکرار مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). پس از انتقال ریزنمونه‌ها به واحدهای کشت، واحدهای کشت به اتاقک رشد با سیکل ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با درجه حرارت $^{\circ}C$ ۲۵ انتقال یافتند. جنین های بدست آمده جهت افزایش رشد و نمو به محیط کشت فاقد هورمون انتقال یافتند.

تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۹/۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح آماری ۵ درصد انجام گردید. هیستوگرام‌ها نیز با استفاده از نرم افزار اکسل (۲۰۱۳) بدست آمد.

جدول۱- تیمارهای اعمال شده جهت القا کالوس زایی

شماره	تیمار
۱	2,4-D به میزان ۱ میلی‌گرم و NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر
۲	2,4-D به میزان ۱ میلی‌گرم و NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر
۳	2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم و NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر
٤	2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم و NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر
٥	2,4-D به میزان ۳ میلی‌گرم و NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر
٦	2,4-D به میزان ۳ میلی‌گرم و NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر
۷	2,4-D به میزان ٤ میلی‌گرم و NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر
۸	2,4-D به میزان ٤ میلی‌گرم و NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر

جدول ۲- تیمارهای اعمال شده جهت القا جنین‌زایی

شماره	تیمار
۱	TDZ به میزان ۲ میکرومولار و NAA به میزان ۰/۲ میکرومولار
۲	TDZ به میزان ۲ میکرومولار و NAA به میزان ۰/۵ میکرومولار
۳	TDZ به میزان ٤ میکرومولار و NAA به میزان ۰/۲ میکرومولار
٤	TDZ به میزان ٤ میکرومولار و NAA به میزان ۰/۵ میکرومولار
٥	TDZ به میزان ٦ میکرومولار و NAA به میزان ۰/۲ میکرومولار
٦	TDZ به میزان ٦ میکرومولار و NAA به میزان ۰/۵ میکرومولار

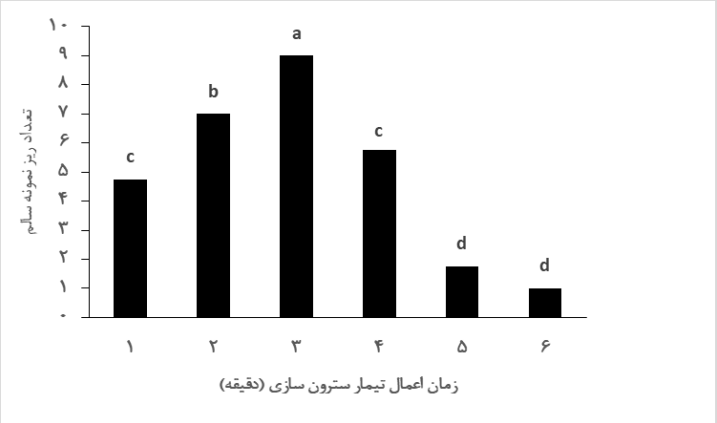
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از اعمال تیمارهای مختلف سترون سازی (جدول۳) ریزنمونه های گردو رقم پکان نشان دهنده اختلاف معنی دار این تیمارها در سطح آماری ۵ درصد بود.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین دانکن (شکل ۱) نیز نشان می‌دهد که تیمار غوطه وری در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱۵ ثانیه و نیز استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۵ دقیقه با میانگین ۹ ریزنمونه سترون و سالم بهترین نتیجه را در سترون سازی ریزنمونه‌ها به همراه داشته است و با بقیه تیمارها اختلاف معنی داری دارد. گزارشات متعددی در استفاده از هیپوکلریت سدیم به تنهایی و یا در ترکیب با الکل ۷۰٪ جهت سترون سازی انواع ریزنمونه های تهیه شده در گیاه گردو وجود دارد. در تحقیقی جهت سترون‌سازی سرشاخه‌های انتهایی گردوی ایرانی مناسب‌ترین روش را غوطه ور کردن جوانه‌ها در محلول اتانل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و بعد استفاده از محلول کلرورمرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ۱,۵ دقیقه عنوان کرد (Imam, 2004).

جدول۳- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف سترون سازی در گردو رقم پکان

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار سترون سازی	۵	٤٤/٥٤*
خطا	۱۸	۰/۳٤۷
کل	۲۳	۹/۹۵



شکل۱- مقایسه میانگین تیمارهای سترون سازی، میانگین تعداد ریزنمونه های سالم و سترون در هر تیمار در گردو رقم پکان. (میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد نداشته و در یگ گروه قرار می‌گیرند)

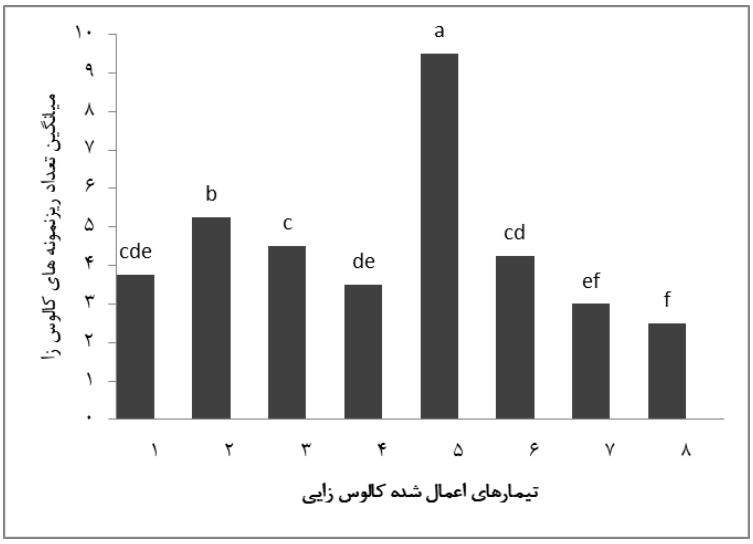
کالوس‌زایی

از آنجایی که کالوس به عنوان ماده اولیه برای کشت‌های سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه و نیز تولید گیاه‌چه به روش غیرمستقیم ضروری می‌باشد، لذا غلظت معینی از تنظیم کننده‌های رشد جهت تولید کالوس، تأثیر دیکلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و نفالین استیک اسید (NAA) بر میزان تولید کالوس رقم پکان گردو در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای مختلف کالوس-زایی(جدول٤) نیز نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح $\alpha=$ ۰/۰۱ وجود دارد. همچنین اثر متقابل دو هورمون مورد استفاده (جدول ۱) بر تعداد کالوس‌های تولید شده در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌دار داشتند این بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه از نظر تأثیر بر صفت مورد مطالعه به صورت مستقل از یکدیگر عمل نمی‌کنند و وابسته به یکدیگر می‌باشند. مقایسه میانگین اثر متقابل (شکل۲) دو هورمون 2-4-D و NAA بر کالوس‌زایی رقم پکان گردو نشان داد بیشترین تعداد کالوس‌زایی در تیمار ۵ (2,4-D به میزان ۳ میلی‌گرم و NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با میانگین ۹/۵ کالوس از ۱۰ ریزنمونه (۹۵ درصد)، به دست آمده است. میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های به کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفولوژیکی تعیین کننده و مهم به شمار میرود (Abbasi *et al.* 2007) البته بین اثرات متقابل هورمون‌های 2, 4-D و NAA در کالوس زایی اثر متقابل افزایشی وجود نداشت، به طوریکه

در بالاترین غلظت هورمونها بیشترین درصد کالوس زایی در ریزنمونه‌های رقم پکان مشاهده نشد در حالی که (Kaur *et al.*, 2006) گزارش کردند که در غلظت کم اکسین ریشه‌های نابه جا حالت غالب دارد و اندام‌زایی را تحریک می‌کند ولی در غلظت زیاد اکسین تشکیل ریشه صورت نمی‌گیرد و تشکیل کالوس اتفاق می‌افتد. نقش اکسین‌ها و اثرات متقابل بین آنها در فرایندهای مورفوژنز در طی تمایز اندامها به خوبی اثبات شده است (Hosseini-Nasr & Rashid, 2002). با این حال در تحقیقی دیگر گزارش شد که غلظت‌های خیلی زیاد هورمون D-2,4 ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافته مهارکننده باشد که با نتایج این آزمایش نیز مطابقت دارد به طوری که کمترین میزان کالوس‌زایی در بالاترین غلظت 2,4-D به دست آمد که متعلق به تیمار شماره ۸ (2,4-D به میزان ٤ میلی‌گرم و NAA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر) بود و البته با تیمار شماره ۷ (2,4-D به میزان ٤ میلی‌گرم و NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) نیز اختلاف معنی‌داری نداشت (Mahmoud *et al.*, 2012). در تحقیقی نیز عنوان نمودند با افزایش میزان اکسین از یک به ۲ میلی‌گرم در لیتر برای 2, 4-D، درصد و حجم کالوس‌زایی نیز کاهش معنی‌داری داشت که این نتیجه را به سمیت یا اثرات منفی کالوس به مقادیر زیادتر اکسین نسبت دادند (Beyramizade *et al.*, 2020) (Peyghamzedeh *et al.* 2011). همچنین در گزارشی دو هورمون IBA در غلظت-های ۰/۰۱ تا ۰/۱ و نیز BAP در غلظت ۱/۵ میلی-گرم در لیتر بصورت ترکیبی می‌توانند موجب تشکیل کالوس از جنین‌های نابالغ گردند. در این پژوهش به دو دلیل از ترکیبات هورمونی توصیه شده توسط این محققین استفاده نگردید. دلیل اول آنکه ترکیبات توصیه شده توسط این محققین برای کشت جنین نابالغ بوده که از نظر میزان هورمون-های درون‌زا کاملا متفاوت با سرشاخه و نیز بخش-های حاوی گره می‌باشد. معرفی یک پروتوکول برای یک گونه گیاهی و بر روی یک نوع ریزنمونه خاص به معنای موثر بودن آن برای سایر گونه‌ها و یا سایر بافت‌ها و یا اندام‌هایی نمی‌باشد. دوم آنکه مقایسه دو هورمون اکسین متداول و ارزان قیمت شامل 2,4-D و نیز نفتالن استیک اسید (NAA) در مقایسه با دو هورمون گران قیمت ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نیز بنزیل آمینوپورین (BA) باعث می‌شود که در برنامه‌های تجاری جنین‌زایی غیرمستقیم که از طریق بافت کالوس حاصل می-شود، محققین در برنامه کالوس‌زایی به استفاده از هورمون‌های ارزان قیمت توجه بیشتری نشان دهند.

جدول٤- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف کالوس زایی، در گردو رقم پکان

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار کالوس سازی	۷	۱۹/۱**
عامل A (2,4-D)	۳	۱۹/٦۹**
عامل B (NAA)	۱	۲/٥۳**
AB	۳	۲٤/۰۳**
خطا	۲٤	۰/۲٦
کل	۳۱	٤/٥۱



شکل۲- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف کالوس‌زایی (جدول ۱) بر میانگین تعداد ریزنمونه‌های کالوس‌زا به روش دانکن(α=۰/۰٥)در گردو رقم پکان. میانگین تیمارهایی که دارای حروف یکسان می‌باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ٥ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

جنین‌زایی

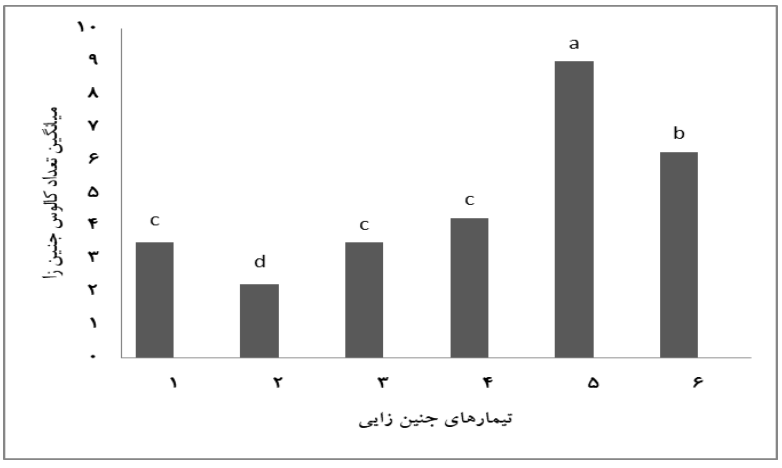
نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای مختلف جنین زایی(جدول ٥) نیز نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح α= ۰/۰۱ وجود دارد. نتایج آزمون دانکن نیز (شکل۳) نشان دهنده این بود که تیمار شماره ٥ شامل TDZ به میزان ٦ میکرومولار و NAA به میزان ۰/۲ میکرومولار به عنوان بهترین تیمار جنین‌زایی رویشی بیشترین تاثیر را در جنین‌زایی به همراه داشته است. این تیمار دارای میانگین ۹ کالوس جنین‌زا بود. محققینی نیز از TDZ در کنار هورمون 2,4-D برای جنین‌زایی گردو استفاده نمودند (Neuman *et al*., 1992; Steager *et al*., 2003). هر دو گزارش مقدار ٥ میکرومولار TDZ را برای جنین‌زایی پیشنهاد نموده‌اند که به نتایج این تحقیق در مقدار استفاده شده از TDZ بسیار نزدیک است لکن در نوع اکسین بکار رفته مطابقتی با نتایج این تحقیق وجود ندارد. در این مطالعه، اکسین NAA مورد استفاده قرار گرفته است. در جنین‌زایی گردو از NAA به میزان ۰/۱ تا ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر استفاده نموده اند. علت افت جنین‌زایی در تیمار ششم می‌تواند به افزایش غلظت هورمون‌های رشد

خصوصا اکسین مربوط باشد (Fernandez *et al.*, 2000). همچنین گزارش شده که در اکثر اثرات اکسین، یک منحنی با فعالیت زنگوله‌ای شکل از غلظت استفاده شده می‌تواند مشاهده گردد. آنها پیشنهاد دادند که در غلظت‌های بالا، اکسین معمولا حالت باز دارنده رشد جنین‌زایی دارد (George *et al.*, 2008). این اثر باز دارنده معمولا به علت افزایش تولید اتیلن در غلظت‌های بالای اکسین است. در هر حال نتایج این مطالعه برای اکسین NAA نشان داد که غلظت بالای ۰/۵ میکرو مولار می‌تواند اثر باز دارنده داشته و منجر به کاهش تولید جنین‌های سوماتیکی گردد. این نکته نباید فراموش گردد که غلظت اشاره شده می‌تواند از اکسینی به اکسین دیگر، از گیاهی به گیاه دیگر و از مرحله ی نموی تا مرحله نموی دیگر متفاوت باشد.

جنین‌های بدنی که به مراحل پیشرفته نمو می-رسیدند، شروع به سنتز کلروفیل تحت شرایط نوری نمودند. به محض اینکه پروسه‌ی بلوغ و رسیدگی جنین اتفاق می‌افتد و کامل می‌شود، جنین‌های سوماتیکی رنگدانه‌های سبز رنگ نرمال را بدست می آورند. کالوس‌های جنین‌زا ترد، محتوی سلولهای گلوبولار شیری رنگ کوچک و کشیده بوده که در واقع از آنها جنین‌ها شکل گرفتند.

جدول۵- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف جنین‌زایی در گردو رقم پکان

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار جنین سازی	۵	۲۳/۹٤**
عامل A	۲	٦/١٦**
عامل B	۱	۷۰/۰٤**
AB	۲	۱۸/٦٦**
خطا	۱۸	۰/۲۳
کل تصحیح شده	۲۳	۵/۳۸



شکل ۳- تیمارهای جنین‌زایی، میانگین تعداد کالوس‌های جنین‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۵) در گردو رقم پکان. میانگین تیمارهایی که دارای حروف یکسان می‌باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

نتیجه‌گیری

جنین‌های سوماتیکی یکی از کاربردی ترین دستاوردهای تکنولوژی کشت بافت گیاهی است. جنین زایی سوماتیکی دارای پتانسیل بسیار بالایی برای حفاظت از ژرم‌پلاسم، ترانسفورماسیون و نیز تولید بذر مصنوعی در برنامه های به نژادی هستند. از سویی دیگر هزینه‌های ناشی از تکثیر انبوه گیاهان با ارزش اقتصادی بالا هنوز هم در مقایسه با روش-های معمول بالاست. به نظر می‌رسد با بهره گیری از تکنولوژی جنین‌زایی بدنی می‌توان میزان تکثیر کلون را به میزان چندین برابر نسبت به روش ریزازدیادی افزایش داد و لذا هزینه‌های تکثیر انواع گونه‌های گیاهی با ارزش نظیر گردو را به روش کشت بافت تقلیل یابد. نتایج حاصل از این تحقیق جهت پیشنهاد دستورالعمل‌های کالوس‌زایی و نیز جنین زایی در گردوی گرمسیری رقم پکان نشان داد که محیط کشت DKW که با ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تکمیل شده بود بهترین نتیجه را در کالوس‌زایی به همراه داشت. TDZ در مقدار ٦ میکرومولار به همراه NAA میزان۰/۲ میکرومولار بهترین نتیجه را در جنین‌زایی کالوس‌های حاصل به همراه داشتند. از آنجایی که ژنوتیپ‌ها و حتی اکوتیپ‌های مختلف از نظر میزان هورمون‌های درون‌زا متفاوتند، توصیه می‌گردد تا برای سایر گونه‌های گردو و یا اکوتیپ‌های مناطق دیگر، کارآمدی پروتوکول‌های معرفی شده پیش از شروع یک برنامه اصلاحی مورد آزمایش قرار گیرند. همچنین نوع بافت انتخاب شده در این تحقیق می‌تواند بر نوع و غلظت هورمونهای درون زا تاثیر گذار باشد.

REFRENCES

Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.Z., 2007. Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 43: 481-492.

Bagheri, A., Saffari, M. 2009. In vitro culture of higher plants. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. p. 406.

Beyramizadeh E., Arminian A., Fazeli. 2020. Impact of growth regulators on callus formation and regeneration of ornamental plant zamiifolia. Journal of Cell & Tissue. 11(3). Pages 221-232. https://doi.org/10.52547/JCT.11.3.221

Ehtesham Nia, A. and Gholami, M. 2017. Investigating phenolic compounds leached from single-node walnut cuttings in DKW liquid culture medium. Technology of plant products, volume 18, number one. pp. 13-31.

FAO. 2014. FAOSTAT database results. http://faostat3.Fao.org.faostat.

Fernandez H, Perez C, Sanchez-Tames R. 2000. Modulation of the morphogenic potential of the embryonic axis of *Juglans regia* by cultural conditions. Plant Growth Regul. 30: 125-131.

George EF. Hall MA. De Klerk G. 2008. Plant propagation by tissue culture- 3rd Ed. The Background. 504.

Haj Hosni, N., Hosseini Moghadam, H. Hossein Sabouri, H. and Zarei. M. 2018. Investigating the effect of the type of culture medium on walnut processing in glass culture. The first national conference on novel ideas in agriculture and natural resources. Page 534. (In Farsi)

Hosseini-Nasr, M. and Rashid, A., 2002. Thidiazuron induced shoot-bud formation on root segments of *Albizzia julibrissin* is an apex-controlled, light independent and calcium-mediated response. Plant Growth Regulation, 36: 81–85.

Imam M. 2004. Asexual regeneration of mature *Juglans regia* by shoot tip culture. Pajouhesh and Sazandegi. 63:10-15.

Kaur, R., N, Sharma. K. Kumar., D. R. Sharma., and S. D. Sharma., 2006. Germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. Scientia Horticulturae. 109, 385 388.

Mahmoud, I., Razzaq, A., Khan, Z.U.D., Hafez, I.A. and Kaleem, S., 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pakistan Journal of Botany, 44:277-284.

Mirjani, L. and M. Emam. 2021. Effective factors of growth regulators on micropropagation of medicinal plant of (Myrtus communis L.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, Vol. 29, No.1. Pages 138-147.

Mostafavi. A. 2008. Walnut proliferation under in vitro conditions in embryo culture, 6th Horticultural Science Congress.

Nejati Saravi, N. Babaian Jolodar, n. Bagheri, N. Pakdin Parisi, A. 2018. Investigating the effect of explant and different levels of NAA and 2-4-D hormones to induce callus in GLYCINE MAX soybean plant. The 6th National Conference of Medicinal Plants of Traditional Medicine and Organic Agriculture

Neuman MC, Preece JE, Van Sambeek JW, Gaffney GR. 1993. Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut. Plant Cell Tissue Organ Culture, 32: 9-18.

Payghamzadeh K., and Kazemitabar S.K. 2011. The effect of two types of culture medium, gibberellic acid and several physical factors on the germination of embryosis Iranian walnut (*Juglans regia* L). Journal of Horticultural Science. Vol. 25, No. 1, P. 45-54

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.

Sadata YA, Hennerty MJ. 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Sci. Horticult. 95:251-260.

SAS Institute. 1997. SAS/STAT user's guid. Version, 6.12., SAS Inst. Cary. NC.

Statistics of the Ministry of Agricultural-Jahad of Iran. 2020.

Steger, M.M., Preece, L.E., Hammerschlag, F., Saxena, P. 2003. The influence of source tree on somatic embryogenesis from eastern black walnut (*Juglans nigra*) immature cotyledons. Acta Hortic. 625:249-252.

Tehami, S.K. Ochi Ardabili, M. Farrokhi, J. 2015. Investigating the effect of plant growth regulators on callus formation of walnut (*juglans Regia* L.) in vitro conditions. The third scientific research congress of development and promotion of agricultural sciences, natural resources and environment of Iran

Yari, M. B., Gholami, M. and Ezniashri, M. 2011. The effect of sampling time, type and arrangement of explant culture and type of antioxidant on the establishment and growth of Iranian walnut explants in vitro. Journal of Horticultural Sciences of Iran, 42 (2) 141-149.

zaker Bostan Abad S, Bakhshi Khaniki G, Mohsennejad F. Asexual Reproduction of Juglans regia L. by using Growth Regulators of IBA and 2,4-D. NCMBJ. 2012; 2 (5):45-51 .

Sustainable Agricultural Science Research /Vol. 4/No. 1/Spring 2024/P: 25 -37

https://www.sarj.iauk.ac.ir

Investigating the Effect of Growth Regulators on Callus Formation and Vegetative Embryogenesis of Pecan Walnut (Carya illinoensis) Under in Vitro Conditions

Mohammad Dali[1], Mohammad Motamedi[*2] and Shahab Sadat Jafari[3]

[1]Graduated from the Department of Plant Production and Genetics, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

[2]Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran

[3]Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

[*]Corresponding Author's Email: Motamedi555@gmail.com

(Received: March. 1, 2024– Accepted: April. 3, 2024)

ABSTRACT

Walnut (Carya illinoensis) is a plant with a high economic value, and the use of micro propagation techniques will be very effective in the vegetative propagation of uniform superior cultivars and genotypes. In order to optimize walnut tissue culture, in this research, fresh branches of Pekan variety trees were separated and transferred to the laboratory. For sterilization, callus formation and somatic embryogenesis, three experiments were performed with different treatments. Six sterilization treatments in a completely randomized design with 4 replications were considered for this research. In order to obtain callus, DKW culture medium was considered as the basic culture medium. 8 treatments of callus formation were investigated in a completely randomized design in 3 replications. In order to achieve indirect somatic embryogenesis, different combinations of TDZ and NAA were investigated in a completely randomized design in 4 replications. The results of analysis of variance of sterilization data indicated the existence of a significant difference between the mentioned treatments. The results of sterilization treatments showed 20% sodium hypochlorite for 5 minutes along with 70% alcohol for 15 seconds as the best result for sterilization of explants. DKW medium supplemented with 3 mg/L 2, 4-D and 0.5 mg/L NAA gave the best result in callus formation. TDZ in the amount of 6 µM along with NAA in the amount of 0.2 µM had the best results in the embryogenesis of the resulting callus.

Keywords: American walnut, embryogenesis, callus, tissue culture