ریزازدیادی پکان (*Carya illinoensis*) از طریق کشت جنین بالغ

مینا غزائیان[۱]، غلامحسین داوری نژاد[۱]، کمال قاسمی بزدی[۲] و حسین نعمتی[۱]
[۱] گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
[۲] سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، ایران.
نویسنده مسئول: davarynej@um.ac.ir

چکیده

پکان (*Carya illinoensis*) از خانواده گردوئیان (Juglandaceae) و از محصولات خشکباری با ارزش در سراسر دنیا می‌باشد. در این آزمایش که به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد، اثر دو نوع محیط کشت و تعدادی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر روی جوانه‌زنی جنین بالغ پکان در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت. محیط کشت‌های مورد استفاده شامل محیط کشت موراشی و اسکوگ (MS) و محیط کشت درختان چوبی (WPM) بودند. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل ایندول بوتیریک اسید (صفر و یک میلی‌گرم در لیتر)، بنزیل آمینو پورین (صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر) و جیبرلیک اسید (صفر و یک میلی‌گرم در لیتر) بودند. نتایج نشان داد که بین محیط کشت‌ها اختلاف معنی‌داری از نظر میزان جوانه‌زنی وجود دارد. بیشترین جوانه‌زنی در محیط کشت MS بود. همچنین بهترین رشد گیاهچه در محیط کشت MS با میزان یک میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید، یک میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک و دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین به‌دست آمد.

کلمات کلیدی: پرآوری، جنین، کشت درون شیشه‌ای، گردوسانان.

مقدمه

خانواده گردوسانان یا Juglandaceae دارای ۷ جنس و حدود ۶۰ گونه می‌باشد. جنس جوگلانز (*Juglans*) و کاریا (*Carya*) از جمله مهم‌ترین جنس‌های این خانواده می‌باشند که دارای ارزش تجاری و اقتصادی هستند. پکان (X)، از جنس کاریا، با ۳۲ عدد کروموزوم، درختانی بزرگ، خزان کننده با پوست خشن به ارتفاع حداکثر ۵۰ متر و قطر تنه ۱۸۰ سانتی‌متر می‌باشند.

جنین در گیاهان یک ساختار چند سلولی است که توانایی تولید یک گیاه جدید را دارا است. جنین گیاهی آغازگر نسل اسپوروفیتی می‌باشد و ممکن است از سلول خاصی مانند سلول تخم و یا از سلول‌های سوماتیکی حاصل شود. اولی تحت عنوان جنین جنسی و دومی به عنوان جنین سوماتیکی یا غیرجنسی شناخته می‌شود. تکنیک کشت درون شیشه‌ای ابزاری قدرتمند در عملیات نجات جنین در جنین‌های نارس و همچنین جنین‌های فاقد آندوسپرم است. موفقیت تولید گیاه از جنین‌های نارس به میزان زیادی وابسته به مرحله رشدی جنین و ترکیب محیط کشت است. با وجود اینکه مرحله رشدی جنین بسیار تعیین‌کننده است اما در مواردی هم مشاهده می‌گردد که جنین‌های بسیار نارس با استفاده از محیط کشت‌های ترکیبی با موفقیت نجات یافته‌اند. هدف از کشت جنین، شکستن خواب، آزمون زیوایی بذر، کاهش دوره اصلاحی و غیره می‌باشد، حال آن‌که نجات جنین به مواردی برمی‌گردد که در آن جنین بدون عملیات نجات و به تنهایی قادر به بقا و تولید نهال نمی‌باشد.

مشکلات زیادی پیرامون کشت درون شیشه‌ای خانواده گردو وجود دارد. درصد پایین جوانه‌زنی و چرخه طولانی ازدیاد بذری گردو و لزوم تیمار سرمادهی از ۳ تا ۶ ماه مهم‌ترین موانع بر سر راه توسعه ارقام پرمحصول از طریق دورگ‌گیری است (Jafari mofidabadi, 2014). هدف از پژوهش حاضر دستیابی به پروتکلی استاندارد برای تکثیر درون شیشه‌ای جنین بالغ در پکان و تعیین بهترین ترکیب هورمونی برای رشد بعدی گیاه حاصله بود.

IrHC2019

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از نمونه میوه رسیده یک ژنوتیپ سازگار بومی در شهر گرگان در استان گلستان برای کشت استفاده شد. میوه‌های رسیده حدود ۵ ماه بعد از گرده‌افشانی جمع آوری شدند. میوه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و پوست‌کنی شدند. میوه ها ابتدا با آب شستشو داده شدند. سپس به مدت دو دقیقه در اتانل ۹۶درصد غوطه ور و سپس با آب مقطر استریل دو بار شستشو داده شدند. سپس میوه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم (وایتکس) با غلظت ۲/۸۳ درصد به مدت ۲۵ دقیقه غوطه‌ور شد و در نهایت ۳ تا ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. با گردوشکن، پوسته چوبی میوه با دقت زیاد و بدون آسیب رساندن به جنین جدا شد و جنین بالغ در شرایط استریل در محیط کشت مورد نظر کشت شد. محیط کشت پایه مورد استفاده برای کشت جنین‌ها، شامل محیط کشت موراشی و اسکوگ (MS) (Murashige and Skoog, 1962) و محیط کشت درختان چوبی (WPM) (McCown and Lloyd,1981) بودند که با میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۹ گرم در لیتر آگار و یک گرم در لیتر زغال فعال غنی شدند. تنظیم pH محیط‌کشت بر روی ۵/۷ تا ۵/۸ و با استفاده از محلول یک نرمال هیدروکسید سدیم و اسید هیدروکلریک صورت گرفت. سپس استریلیزاسیون در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده شامل ایندول بوتیریک اسید (IBA) به میزان صفر و یک میلی‌گرم در لیتر، بنزیل آمینو پورین (BAP) به میزان صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر و اسید جیبرلیک (GA_3) به میزان صفر و یک میلی‌گرم در لیتر بودند. جیبرلیک اسید به دلیل حساسیت به گرما بعد از اتوکلاو و زمانی‌که دمای محیط کشت به حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید در شرایط استریل و با استفاده از فیلتر سرنگی (با قطر ۰/۲۲ میکرون) به محیط کشت‌ها اضافه شد. بعد از کشت، تمام محیط کشت‌ها در ژرمیناتور در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۸۰۰ لوکس با نور فلورسنت برای مدت ۴ هفته قرار گرفتند. تمام کشت‌ها برای یک هفته در تاریکی قرار داده شده و سپس در معرض نور مورد نظر قرار گرفتند. بعد از یک‌ماه، گیاهچه‌های قوی به خاک استریل با ترکیب پیت‌ماس: ماسه نرم: پرلیت با نسبت ۱:۱:۱ انتقال یافته و پس از طی مراحل سازگاری به گلخانه منتقل شدند. تیمارهای هورمونی مورد استفاده در جدول شماره یک آمده است. یادداشت برداری نهایی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، طول ساقه و تعداد برگ در روز ۲۵ پس از کشت ثبت شد. داده‌های حاصله با نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تعیین اختلاف آماری بین میانگین‌ها نیز از آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح (P=0.05) استفاده شد.

جدول۱- تیمارهای هورمونی مورد استفاده برای هر یک از محیط کشت‌های MS و WPM.

تیمار	IBA	GA_3	BAP	تیمار	IBA	GA_3	BAP
T1	0	0	0	T7	1	0	0
T2	0	0	1	T8	1	0	1
T3	0	0	2	T9	1	0	2
T4	0	1	0	T10	1	1	0
T5	0	1	1	T11	1	1	1
T6	0	1	2	T12	1	1	2

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در دو بخش زیر مورد مقایسه قرار گرفتند:

تاثیر نوع محیط کشت

در پژوهش حاضر نوع محیط کشت بر روی آغاز جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری نداشت و کم‌ترین تعداد روز برای جوانه‌زنی ۶ روز ثبت شد. ولی نوع محیط کشت توانست درصد جوانه‌زنی و فاکتورهای رشدی گیاهچه را تحت تاثیر قرار دهد. بر این اساس بیشترین درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، طول ساقه و تعداد برگ در محیط کشت MS بود (جدول۲).

IrHC2019

در آزمایش حاضر بر روی پکان، طول ریشه‌ها در محیط کشت MS بیشتر از WPM بود. Mapelli و همکاران (۲۰۰۱) 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 در انتقال آمینو اسیدهای آزاد و همچنین انتقال مجدد نیتروژن ذخیره شده در هنگام جوانه‌زنی گردو ایفا می‌کند. وجود مقادیر ناچیز این آمینو اسید غیرپروتئینی در مغز و مقادیر بالای آن در لپه‌ها، بند جنینی، نوک ریشه و ساقه در دانهال‌های یک ماهه گردو حاکی از آن است که سنتز جدید این ماده طی مدت جوانه‌زنی بذر رخ می‌دهد. مقادیر زیاد ویتامین‌های موجود در محیط کشت MS ممکن است از طریق شرکت در واکنش‌های دکربوکسیلاسیون اسیدهای آلفا ستونی، ترانس‌آمیناسیون، واکنش‌های اکسیداسیون و احیا و غیره در چرخه‌های مختلف زیستی باعث افزایش سنتز سیترولین و اسید آمینه‌های آزاد در ریشه اصلی گیاهچه‌های گردو شده و در نتیجه باعث افزایش رشد ریشه‌ها می‌گردد. پیغام‌زاده و همکاران (۲۰۱۱) در آزمایشی به بررسی اثرات دو نوع محیط کشت (MT وDKW)، غلظت GA_3 و تیمارهای فیزیکی بر روی جوانه‌زنی جنین بالغ گردوی ایرانی پرداختند. درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و طول شاخه اصلی در محیط کشت DKW تغییر یافته، موقعیت تاریکی همراه با تیمار سرما و ۲ میلی‌گرم اسید جیبرلیک نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر بود.

جدول۲- مقایسه میانگین تاثیر نوع محیط کشت بر روی دوره و درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه حاصل از جنین بالغ پکان.

محیط کشت	دوره جوانه‌زنی (روز)	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه (میلی‌متر)	تعداد برگ	طول ریشه اصلی (میلی‌متر)
MS	8.66 a	87.963 a	21.91 a	1.91 a	36.36 a
WPM	8.08 a	57.40 b	9.63 b	1.00 b	18.19 b
LSD p≥0.05	2.61	8.55	5.39	0.5	9.10

میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

تاثیر هورمون‌های رشد بر جوانه‌زنی و فاکتورهای رشد گیاهچه:

نتایج نشان داد که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، تاثیر معنی‌داری بر روی دوره و میزان جوانه‌زنی، طول ریشه، طول ساقه و تعداد برگ داشتند (جدول۳). بیشترین درصد جوانه‌زنی در تیمارهای T11 (یک میلی‌گرم در لیتر IBA ، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و یک میلی‌گرم در لیتر BAP) و T12 (یک میلی‌گرم در لیتر IBA، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و دو میلی‌گرم در لیتر BAP) بود. لذا در این آزمایشات، بین غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و دو میلی‌گرم در لیتر BAP تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. از طرف دیگر، در تیمار بدون سرمادهی تیمار T12 (یک میلی‌گرم در لیتر IBA، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و دو میلی‌گرم در لیتر BAP) دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود. Hu و همکاران (۲۰۱۱) بر روی کشت درون شیشه‌ای جنین نابالغ هیکوری (*Carya cathayensis*) که یک گونه زینتی از جنس کاریا می‌باشد تحقیق نمودند. بیشترین جوانه‌زنی و رشد در محیط کشت MS با میزان دو میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 حاصل شد. در آزمایشی برای کشت جنین نابالغ پکان از محیط کشت DKW استفاده شد و بهترین رشد جنین در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیترIBA و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 به‌دست آمد (Peighamzadeh and Kazemitabar, 2010). Renukdas و همکاران (۲۰۱۰) توانستند گیاهچه‌های پکان (*Carya illinoinensis*) حاصل از کشت جنین بالغ را با کارایی بالایی در محیط کشت MS به‌دست آوردند. بهترین تیمار در این آزمایش شامل ۱۸ میکرومول BAP و ۵ میکرومول IBA بود. در تحقیق Toosi و همکاران (۲۰۱۰) در پرآوری جنین بالغ گردو بهترین محیط کشت NGE بود و بهترین تیمار شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. Haroon و

IrHC2019

Aftab (۲۰۰۸) در آزمایش خود بر روی کشت لپه پکان، بیشترین رشد ساقه و پرآوری را در محیط کشت MS و با غلظت ۱۵ میکرومول BAP به‌دست آوردند. در تحقیق Kaur و همکاران (۲۰۰۶) در ریزازدیادی گردو از طریق کشت درون‌شیشه‌ای جنین بالغ محیط کشت MS با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 بهترین جوانه‌زنی را نشان داد. Sanchez-Zamora و همکاران (2006) در تحقیق خود در گردو نشان دادند بهترین محیط کشت WPM و بهترین محیط کشت پرآوری محتوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. Saadata و Hennerty (۲۰۰۲) فاکتورهای موثر بر پرآوری را در گردو بررسی نمودند و به مقایسه محیط کشت‌های مختلف، تنظیم کننده‌های رشد و فاکتورهای سفت کننده محیط پرداختند. جمع‌بندی آنها حاکی از آن بود که بهترین محیط کشت برای جوانه‌زنی جنین کامل گردو، محیط کشت DKW با میزان ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل بود که با یک میلی‌گرم در لیتر IBA غنی شده بود.

جدول۳- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر روی دوره و درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه حاصل از جنین بالغ پکان.

تیمار هورمونی	دوره جوانه‌زنی (روز)	درصد جوانه‌زنی	طول ساقه (میلی‌متر)	تعداد برگ	طول ریشه اصلی (میلی‌متر)
T1	6a	50c	6.66d	0.66ed	19.17bc
T2	11.33a	72.22b	11.66dc	1.16bcde	16bc
T3	7a	55.56bc	5.83d	0.83cde	21.67bc
T4	7a	72.22b	11.50dc	1.5abcde	36.67ab
T5	8.33a	27.78d	5d	0.33e	11.83c
T6	10.66a	100a	15dc	1.5abcde	25.83abc
T7	5.33a	50c	16.66dc	1.83abcd	25abc
T8	7.83a	72.22b	20bc	1.66abcd	34.17ab
T9	10.50a	72.22b	13.33dc	1.16bcde	21.67abc
T10	8.50a	100a	30.83ab	2abc	31.83Abc
T11	10.33a	100a	16.66dc	2.16ab	37ab
T12	7.66a	100a	36.16a	2.66a	41.5a
LSD	6.41	20.96	13.21	1.24	22.29

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

مشاهده تمام این منابع حاکی از آن است که تعیین شرایط درون شیشه‌ای مناسب رشد برای هر نوع گونه گیاهی ضروری است و بایستی بهترین محیط کشت در جوانه‌زنی درون شیشه‌ای و بهترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای پرآوری مورد آزمون و سنجش قرار گیرد. Obeidy و Smith (۱۹۹۳) ارگانوژنز را از لپه‌های بالغ پکان و بندهای جنینی به‌دست آوردند. بندهای جنینی در محل گره‌های لپه‌ها تشکیل ۸۵ درصد ریزشاخه نمودند و ۳۰ درصد آنها در محیط کشت عاری از اکسین بعد از پیش تیمار با ۲۰ میکرومول ایندول بوتیریک اسید (IBA) تولید ریشه نمودند. جوانه‌های نابجا بر روی سطح کالوس ظاهر شدند. این کالوس در محیط کشت محتوی TDZ (۲۵ میکرومول) و بر روی گره‌های لپه و ریشه‌چه تولید شده بود. در تحقیق حاضر، گیاهچه‌های حاصله در همه محیط کشت‌ها دارای ریشه قوی‌تری نسبت به ساقه بودند. نتایج مشابه در تحقیق Kaur و همکاران (۲۰۰۶) در کشت جنین بالغ گردو نیز به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری

پکان مانند گردو یکی از گیاهان سخت بارزا[1] در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. بنابراین شناخت محیط کشت مناسب برای جوانه‌زنی و سپس پرآوری آن در شرایط درون شیشه‌ای ضرورت دارد. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند برای تولید سریع و آسان نهال پکان در شرایط درون شیشه‌ای به‌کار گرفته شود. نهال‌های کشت بافتی حاصله می‌تواند ماده

[1] recalcitrant

IrHC2019

اولیه برای مطالعات دیگر در زمینه‌های فیزیولوژی، بیماری‌شناسی، بیوتکنولوژی، تولید پایه مادری و غیره باشد. در این تحقیق بهترین محیط غذایی برای جوانه‌زنی و پرآوری جنین بالغ پکان محیط کشت MS بود. همچنین بهترین تیمار برای جوانه زنی جنین بالغ پکان شامل یک میلی‌گرم در لیتر IBA، یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 و دو میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

منابع

Haroon, A. and Aftab, F. 2008.Adventitious regeneration of pecan using immature cotyledonary explant. Genomics, Proteomics, Metabolics: Recent trends in biotechnology, 352-354.

Hu, H., Zhang, Q., Jiang, X., Huang, J., Han, K., Shen, Y., Lv, F. and Huang, F. 2011. Efficient immature embryo germination in vitro of hickory (*Carya cathayensis* Sarg.). Propagation of Ornamental Plants, 11 (2): 96-101.

Jafari mofidabadi, A. 2014. Application of Embryo Rescue Technique in *Juglans regia L. x J. nigra L.* Hybridization. Journal of Medicinal Plants and By-products, 2: 211-214.

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.

Mapelli, S., Bram Billa, I. and Bertani, A. 2001. Free amino acids in walnut kernels and young seedlings. Tree Physiology, 21: 1299-1302.

McCown, B.H. and Lloyd, G. 1981. Woody Plant medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. Hortscience, 16: 453.

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Obeidy,A. and Smith,M.A.L. 1993. Organogenesis and somatic embryogenesis from mature pecan embryonic axes. Horticulture Science, 28: 213-215.

Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. and Amiri, A. 2011. Effects of Two Type of Medium Cultures, Gibberellic Acid and Some Physical Factors on Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Embryos Germination. Journal of horticulture science, 25 (1): 45-54.

Payghamzadeh, K. and Kazemitabar, S.K. 2010. In vitro germination of Pecan (*Carya illinoinensis*) embryo. Biharean Biologist, 4 (1): 37-41.

Renukdas, N.N., Manoharan, M. and Garner,J.O. 2010.In vitro propagation of pecan [Carya *illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. Plant Biotechnology, 27: 211-215.

Saadata, Y.A. and Hennerty, M.J. 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Scientia Horticulturae, 95: 251–260.

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.

Toosi, S., Dilmaghani, K. and Hikmatshoar, H. 2010. Proliferation of *Juglans regia* L. by in vitro embryo culture. Middle East Journal of scientific research, 6 (1): 1-7.

IrHC2019

In vitro micropropagation of pecan (*Carya illinoensis*) embryo.

Mina Ghazaeian[1], Golamhossein Davarinejad[1*], Kamal Ghasemi[2] and Hossein Nemati[1]
[1]Department of Horticultural Science and Landscape, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[2] Cotton Research Institute of Iran. Agricultural research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan,Iran.
[*]*Corresponding author: davarynej@um.ac.ir*

Abstract

Pecan (*Carya illinoensis*) is a member of the Juglandaceae family and is one of the most valuable nut products all over the world. In this experiment, the effect of two types of culture medium and some of the plant growth regulators on in-vitro germination of mature embryos of pecan has been determined. The medium were Murashige and Skoog (MS) and Woody plant medium (WPM). Plant growth regulators were IBA (0 and 1 mgl^{-1}), BAP (0, 1 and 2 mgl^{-1}) and GA3(0 and 1 mgl^{-1}). As the results showed, there was significant differences between medium. maximum percentage of germination was in MS medium.The best growth of micro plant achieved in MS medium with 1 mgl^{-1}IBA, 1 mgl^{-1}GA3 and 2 mgl^{-1}BAP.

Keywords: juglandaceae, in-vitro propagation, proliferation, embryo.

IrHC2019