ریزازدیادی گردو (*Juglans regia* L.) با استفاده از کشت جنین در شرایط *in vitro*

ابراهیم مصطفوی (۱)، محسن فردوسی (۲)، مجید دانا (۳)

۱- عضو هیات علمی مرکز پیام نور گناباد، ۲- دانشجوی زیست شناسی پیام نور گناباد، ۳- محقق پژوهش سرای پیامبر اعظم (ص) آموزش و پرورش گناباد

یکی از روش های نسبتاً جدید و با اهمیت برای تکثیر بعضی از گیاهان از جمله گردو به عنوان یکی از تولیدات مهم کشاورزی در ایران تکنیک ریزازدیادی یا کشت بافت است. در این روش تکثیر گیاه در فاصله زمانی کم و با کمیت زیاد امکان پذیر می باشد. در این پژوهش کالوس زایی، تمایز و ریزازدیادی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) مورد بررسی قرار گرفت. از جنین گردو ریز نمونه (explant) تهیه گردید. نمونه ها برای کالوس زایی بر روی محیط کشت WPM (Woody Plant Medium) با و بدون استفاده از هورمون IBA (Indole Butyric Acid) مورد بررسی قرار گرفت. به جهت جلوگیری از آلودگی های قارچی جنین های مورد استفاده سترون گردیدند. مراحل مختلف آزمایش در دمای ۲۵°C و تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس انجام شد. تمایز در توده های کالوس ایجاد شده مشاهده گردید. نتایج نشان داد که در محیط کشت WPM همراه با کاربرد هورمون IBA باززایی ریشه ۷۰ و باززایی یا تمایز ساقه ۶۰ درصد و بدون استفاده از هورمون این داده ها کمتر از ۵۰ درصد برای ریشه و ساقه بود. در این مطالعه اگرچه تعدادی از محیط های کشت حاوی ریزنمونه تا پایان آزمایش به گیاهچه تبدیل نگردیدند ولی با این حال حدود ۶۰ درصد تکرارها پس از کالوس زایی و تمایز منجر به گیاهچه شدند که درصد بالاتر مربوط به تیمار محیط کشت همرا با IBA بود. مقایسه نتایج حاصل از تیمارهای محیط کشت مشخص کرد که استفاده از هورمون IBA جهت بهبود ریزازدیادی جنین گردو مناسب می باشد.

واژه های کلیدی: کالوس، کشت بافت، گردو ، ریزازدیادی.

مقدمه

از نکات قابل توجه در استفاده از کشت بافت برای گیاه گردو طولانی بودن زمان تکثیر و مشکل در پیوند کردن گیاه در شرایط طبیعی و مزرعه می باشد (۲و۱۵). تکثیر گردو از طریق کشت بافت دارای سابقه ای نسبتاً طولانی است بطوریکه در سال ۱۳۶۹ پژوهشگران با کشت ریز نمونههایی (explants) از شاخههای گیاه گردوی سیاه موفق به تولید کالوس گردیدند (۵،۶و۹). ریز ازدیادی موفق گردوی ایرانی توسط تعدادی از محققین دیگر نیز گزارش گردیده است (۱،۷،۸،۱۱ و۱۳).

Rodriguez (۱۲) با کاربرد ریز نمونه هایی از ساقهٔ، جنین و ریشه کالوس و در نهایت ریشه تولید نمود. مطالعات بر روی ریزازدیادی این گیاه با کشت ریز نمونه هایی از جنین آن توسط محققین مختلفی بررسی گردیده است. کاشت جنین به صورت in vitro نه تنها برای تکثیر گردو بلکه به طور گسترده ای در اصلاح ژنتیکی گونه های گیاهی مورد استفاده می باشد (۵،۱۰ و۱۴). ازآنجا که در کشت بافت و ریز ازدیادی در شرایط in vitro همواره نوع محیط کشت، ریزنمونه و دیگر شرایط مطلوب برای جوانه زنی و رشد گردو حائز اهمیت می باشد پژوهشگران تلاش کرده اند تا محیط کشت و شرایط in vitro را برای ریز ازدیادی این گیاه مورد بررسی قرار دهند. در این ارتباط محیطهای کشت

مختلفی همچون DKW، MS و WPM توسط محققین مورد استفاده قرار گرفته و نتایج متفاوت و موفقی گزارش گردیده است(۵و۱۴).

مواد و روش ها

برای تهیه ریزنمونه ها از گردوهای منطقه دیسفان گناباد که در پاییز سال ۱۳۸۷ جمع آوری گردیده بود استفاده شد. نمونه های جمع آوری شده ابتدا با استفاده از هیپوکلریت سدیم با غلظت ۱٪ به مدت ۲۰ دقیقه ضد عفونی گردیدند و سپس سه بار با آب استریل شسته و آنگاه برای مدت ۹ روز جهت نرم شدن پوست و متورم شدن جنین در آب مقطر قرار گرفتند. پس از آن تحت شرایط استریل جنین از پوسته گردو خارج و بصورت طولی به قسمت هایی تقسیم و هر یک از این قسمتها به عنوان یک ریزنمونه در اتانل الکل ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی و آنگاه سه بار پس از شستشوی آنها با آب استریل به محیط کشت تهیه شده منتقل گردیدند. محیط کشت WPM (Woody plant Medium) با مصرف پودر آگار (Himedia Laboratories Ltd.) و با و بدون مصرف هورمون IBA بصورت استاندارد و با استفاده از مواد و عناصر مشخص شده (جدول۱) تهیه گردید (Sanchez et al. 2006). محیط کشت های آماده شده پس از حرارت دادن و یکنواخت کردن به ظروف شیشه ای و به ازای هر ظرف ۲۰ میلی لیتر منتقل و آنگاه اتوکلاو (Auto clave) گردیدند (دما ۱۲۱°C، زمان ۲۰ دقیقه).

پس از این مرحله و سرد شدن ظروف حاوی محیط کشت، ریزنمونه های تهیه شده تحت شرایط استریل به این محیطها منتقل و سپس در داخل فایتوترون (Phytotron growth cabinet) تحت شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت ۳۰۰۰ lx و دمای ۱°C±۲۳ قرار گرفتند. شرایط محیط آزمایش و کالوس زایی ریزنمونه ها بطور مستمر کنترل و زمان وقوع و تمایز و ظهور ریشه و سایر اندامها و در نهایت ظهور گیاهچه ثبت گردید. نمونه های آلوده شده از مجموعه کشتها حذف شدند. دوره انجام آزمایش حدود ۳۵ روز بطول انجامید و در پایان آن ریز نمونه‌های تبدیل شده به گیاهچه و یا گیاهچه‌های بوجود آمده شمارش گردیدند. تعداد ۲۰ تکرار برای هر یک از محیط‌های کشت حاوی ریز نمونه ها در نظر گرفته شد بطوری که در مجموع ۴۰ محیط کشت دارای ریز نمونه تهیه شده به دو گروه شاهد و دارای هورمون (گروه تیمار) تقسیم شدند. داده ها با استفاده از تست کای مربع (X^2) آنالیز و مقایسه گردید.

بحث و نتایج

با توجه به داده های نشان داده شده در جدول شماره ۲ از ۲۰ تکرار محیطهای کشت حاوی ریزنمونه دارای هورمون IBA تعداد ۱۵ محیط منجر به تولید گیاهچه گردو گردیدند در حالی که این تعداد برای ظروف حاوی محیط کشت شاهد یا بدون هورمون ۹ عدد بود. در مجموع پس از ۳۲ روز از آزمایش از ۴۰ محیط کشت دارای ریزنمونه ۲۴ گیاهچه تشکیل و در تعداد ۱۶ محیط کشت دیگر برخی به کالوس زایی، تولید ریشه و یا ساقه رسیدند و در تعدادی هم این مراحل عملی نگردید. با استفاده از نتایج آماری حاصل از انجام تست x^2 برای گروه های جدول ۲ می توان استنباط کرد که هورمون IBA در منجر شدن ریزنمونه های کشت شده به گیاهچه مؤثر بوده است (نتایج در سطح ۵٪ معنی دار می باشد). مقایسه درصد باززایی ریشه و ساقه در توده های کالوس ایجاد شده نیز مؤید تأثیر IBA در بهبود این دو پدیده بود بطوریکه درصد باززایی ریشه و ساقه در تیمار دارای IBA به ترتیب حدود ۷۰ و ۶۰ و این داده ها برای گروه بدون IBA (شاهد) کمتر از ۵۰ درصد محاسبه گردید.

در این مطالعه اگرچه که تعدادی از ریزنمونه های کشت شده پس از اتمام مراحل مربوطه به گیاهچه تبدیل نگردیدند ولی با این حال حدود ۶۰ درصد آنها بطور موفقیت آمیزی منجر به گیاهچه شدند. Sanchez و دیگران (۲۰۰۶) نیز با استفاده از محیط کشت WPM نتایج بهتری را از کشت ریزنمونه جنین گردو (*Juglans regia* L.) در مقایسه با دیگر محیطهای کشت (MS و DKW) بدست آورده و گزارش کرده اند استفاده از هورمون رشد IBA در این آزمایش به تولید گیاهچه های بیشتری از ریزنمونه ها انجامیده است. استفاده از انواع هورمونها یا تنظیم کننده های رشد گیاهی خصوصاً IBA در آزمایشات انجام شده توسط Tetsumura و همکاران (۲۰۰۲) و Sanchez et al. (۲۰۰۶) و تأثیر موفق آن بر نتایج حاصله از این پژوهش ها گزارش شده اند. با بررسی نتایج این مطالعه می توان امکان استفاده از IBA را همراه با محیط کشت WPM در بهبود کالوس زایی، تمایز و در نتیجه تولید گیاه کامل (گیاهچه) در نظر داشت. از آنجا که گیاه گردو یکی از گونه های مناسب برای تکثیر توسط ریزازدیادی است بنابراین لازم است که شرایط مطلوب ریزازدیادی آن چه از نظر نوع محیط کشت و چه مصرف تنظیم کننده های رشد گیاهی و سایر شرایط in vitro تعیین گردد.

منابع مورد استفاده

۱ – امام، میترا.۱۳۸۳. بررسی تکثیر غیر جنسی گردوی بالغ ایرانی (*juglems regia*) با کشت سر شاخه های انتهایی. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی.

۲– باقری، ع. ، و مدیری، م. ۱۳۷۳. مبانی کشت بافت گیاهی (آر. ال. ام. پیریک). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۳ – وحدتی، ک. ۱۳۷۳. بررسی جنبه های مختلف تکثیرغیر جنسی گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه ای و مزرعه. پایان نامهٔ فوق لیسانس.

4- Bosela, M. J., and Michler, C. H. 2008. Media effects on black walnut (*Juglans regia* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulation and cytokinin types. In vitro cell Dev. Biol. Plant. 44:116-121.

5- Driver, J. A. and A. H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. HotrScience 19: 507-709.

6- Jay-Allemand C., P. Capelli and D. Cornu. 1992. Root development of in vitro hybrid walnut microcutting in a vermiculite containing gelrite medium. Scientia Hortic. 51: 335-342.

7- Kurz, W. G. W. 1998. Semi continuous metabolite production through repeated elicitation of plant cell cultures: A novel process. In T. Y. Mabry (ed), Plant biotechnology. 93-103.

8- Leslie, C. and G. Mcgranahan. 1992. Micropropagation of Persian walnut (*Juglans regia* L.). p. 136-150. In:Y.P.S. Bajaj (ed). Biotechnology in agriculture and forestry, 18:High-tech and micropropagation II. Springer-Verlag, Berlin.

9- McGranahan, G., C. A. Leslie and J. A. Driver. 1988. *In vitro* propagation of mature walnut cultivars. HortScience 23: 220.

10- Ramming, D. W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25: 393-398.

11- Revilla, M. A., Majada, J., Rodrigues, R. 1989. Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. Ann. Sci. For. (Paris)46: 149-151.

12- Rodriguez, R. 1982. Stimulation of multiple shoot- bud formation in walnuts seeds. HortScince 17: (4), 592.

13- Saadat, Y. A., Hennerty, M. J. 2002. Factors affecting shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Scientia Horticulturae 95: 257-260.

14- Sanchez-Zamora, M. A., Cos- terrer, J., Frutos-Tomas, D., and Garcia-Lopez, R. 2006. Embryo germination and proliferation in vitro of *Juglans regia* L., Scientia Horticulturae. 108: 317-321.

15- Tetsumura, T., Tsukuda, K., and Kawase, K. 2002. Micropropagation of shinano walnut (*Juglans regia* L.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 17:661-663.

Micropropagation of Persian walnut (*Juglans regia* L.) by embryo culture

E. Mostafavi, M. Ferdowsi and M. Dana*

*Payame Noor University, Gonabad Centre

Abstract

One of the new and important ways of plant propagation is micropropagation or tissue culture technique. Using this technique is preferred more due to its vast propagation of plants in short periods. This research presents an investigation on media and culture conditions for in vitro proliferation of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Prepared embryo segments (explants) produced callous and new shoot and root on WPM (woody plant medium) with and without the usage of IBA (Indole Butyric Acid) hormone. An experiment was carried out under conditions of 25ºC, light/dark period of 16 and 8 hours and a light intensity of 3000 lux. Results showed that root and shoot proliferation percentage on WPM supplemented with 0.5mg IBA hormone were 70 and 60 percent respectively, whereas without using IBA the these data were less than 50 percent. How ever, after the end of experiment about 60% of replications resulted to seedling (completed plant). Comparing medium treatments indicates that the appliance of IBA improved and promoted micropropagation of walnut.

Key words: WPM, Callus, Tissue culture, Micropropagation, *Juglans regia*