Plant Production and Genetics
Vol. 3, No. 2, Autumn & Winter 2022, p. 305-316

تولید و ژنتیک گیاهی
جلد ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحه ۳۱۶-۳۰۵

مقاله پژوهشی

DOI: 10.34785/J020.2022.011

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی گردو (*Juglans regia* L.) رقم چندلر

کوثر شیرالی[۱]، پیام پورمحمدی*[۲]، خلیل عالمی سعید[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۳. دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰

چکیده

گردو با نام علمی (*Juglans regia* L.) از خانواده گردوسانان (Juglandaceae) یکی از گونه های مهم خوراکی در میان خشکمیوه‌ها است. به‌منظور تعیین بهترین تیمار کالوس‌زایی و اندام‌زایی روی ریزنمونه‌ی برگ و جوانه گردو در محیط کشت DKW آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. در آزمایش اول که روی ریزنمونه برگ انجام شد، فاکتور اول تنظیم‌کننده‌ی رشد 2,4-D با غلظت‌های صفر، ۳،۲،۱ میلی‌گرم در لیتر و فاکتور دوم تنظیم‌کننده رشد TDZ با غلظت‌های صفر، ۴،۲،۱ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش دوم که با استفاده از ریزنمونه‌های جوانه انجام گرفت، تنظیم‌کننده رشد BAP با غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر و تنظیم‌کننده رشد IBA با غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۱، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول، بیشترین تعداد کالوس‌زایی در محیط کشت DKW حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و بیشترین میزان قهوه‌ای شدن برگ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ ایجاد گردید. در آزمایش دوم بیشترین میزان اندام‌زایی در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون حضور BAP مشاهده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، امکان کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ در محیط کشت DKW حاوی ۳ میلی‌گرم 2,4-D و اندام‌زایی از ریزنمونه جوانه در محیط کشت DKW حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر وجود داشت. همچنین در تیمار حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، کالوس‌زایی از ریزنمونه جوانه گردو مشاهده شد.

کلیدواژگان: اکسین، اندام‌زایی، سایتوکینین، کالوس‌زایی، گردو

* ایمیل نویسنده مسئول: Mohamadi@Asnrukh.ac.ir

مقدمه

گردو (*Juglans regia* L.) از خانواده Juglandaceae یکی از درختان خشکباری جهان به شمار می‌آید. این گیاه دارای ۷ جنس مهم از نظر تولید میوه است. تعداد ۲۰ گونه از این جنس در دنیا کشت می‌شود (Bagheri and Saffari, 2009). در فلات ایران، گردو در عرض‌های جغرافیایی ۲۹ تا ۳۹ درجه شمالی و طول جغرافیایی ۴۵ تا ۶۴ درجه شرقی، از مناطق پست تا ارتفاع ۲۵۰۰ متر از سطح دریا، به‌صورت اهلی و وحشی در مناطق شمال، غرب و مرکز کشور یافت می‌شود (Vahdati and Khalighi, 1999). بر اساس آمار سازمان خواربار جهانی[1] تولید جهانی این محصول در سال ۲۰۲۰ حدود ۳/۷۵ میلیون تن بود که در بین کشورهای تولیدکننده، ایران با تولید سالانه ۳۵۶ هزار تن پس از کشور چین و آمریکا در مقام سوم قرار دارد (FAO, 2020). از صدها سال پیش، تکثیر گردو در اکثر نقاط دنیا از طریق کاشت بذر صورت می‌گرفته است. از آنجا که درختان گردو به میزان زیادی هتروزیگوت و دگرگرده‌افشان هستند، یعنی در درختان حاصل از کاشت بذرها یک درخت مشابه والد مادری خود نمی‌شود، درختان بذری از نظر کیفیت و میزان تولید به مقدار زیادی باهم متفاوت هستند. لذا در حال حاضر از این روش فقط برای ایجاد تنوع ژنتیکی و در کارهای اصلاحی استفاده می‌شود (Vahdati and Mojtahed, 2006). روش‌های قدیمی مانند روش‌های کلاسیک تکثیر گیاهان، دیگر پاسخ‌گوی درخواست روزافزون تولیدات گیاهی نبوده و بایستی روش‌های جدیدی جایگزین گردند. به نظر می‌رسد یکی از راه‌های رسیدن به این افزایش تولید، استفاده از کشت بافت می‌باشد (Bagheri and Saffari, 2009). رقم چندلر از تلاقی رقم پدرو با ژنوتیپ UC ۵۶-۲۲۴ به‌دست آمده است که دارای عملکرد بالا بوده و گلدهی آن به‌صورت جانبی می‌باشد، به‌طوری که ۸۶ درصد جوانه‌های جانبی به گل تبدیل می‌شوند. در بررسی‌های انجام‌شده در ایران این رقم بیشترین مقاومت را به سرمای زمستانه در بین ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی‌شده نشان داده است. گردوی چندلر دیررس بوده و کارهای کشت بافتی زیادی با موفقیت روی آن انجام شده است. بر اساس تحقیقات انجام‌شده در ایران، رقم چندلر ریشه‌زایی متوسطی را در محیط کشت بافت از خود نشان می‌دهد. لذا تکثیر این رقم گردو از طریق کشت بافت ضروری به‌نظر می‌رسد و مطالعه حاضر به‌منظور شناخت اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی آن انجام شد (Mojtahed, 2016).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نهال‌های گردوی چندلر پیوندی (شکل ۱) از گلخانه تولیدی شرکت ایران گردو واقع در استان آذربایجان غربی شهرستان خوی تهیه شدند و تا زمان جداسازی قطعات برگ و جوانه در دمای ۱±۲۵ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان نگه‌داری شدند.

شکل ۱- گیاهان مادری گردو رقم چندلر

[1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)

استریل کردن ریزنمونه‌ها

به‌منظور تهیه ریزنمونه، از برگ‌ها و جوانه‌های جوان استفاده شد. برای استریل کردن ریزنمونه برگ، ابتدا قطعات برگ، جداسازی شده و با آب جاری و مایع صابونی به مدت ۱۰ دقیقه شستشوی سطحی انجام شد. سپس در زیر هود لامینار در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت پنج دقیقه غوطه‌ور شدند و در نهایت سه بار و هر بار به مدت دو دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای استریل کردن ریزنمونه جوانه نیز، قطعات جوانه (به میزان ۳ تا ۵ سانتی‌متر) جداسازی و با آب جاری و مایع صابونی، به مدت ۱۵ دقیقه شستشوی سطحی انجام شد. سپس در زیر هود لامینار در هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد به مدت پنج دقیقه غوطه‌ور شدند و در نهایت سه بار و هر بار به مدت دو دقیقه با آب مقطر استریل‌شده شستشو داده شدند.

آزمایش اول

آزمایش اول که روی برگ گردو انجام شد، پس از استریل کردن ریزنمونه‌ها، محیط کشت DKW که دارای ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز است، به‌عنوان محیط کشت پایه مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی ۱۶ ترکیب تیماری متفاوت (جدول ۱) در یک آزمایش فاکتوریل دو فاکتوره، با طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. هر تکرار شامل یک پتری‌دیش (محتوی تیمار کالوس‌زایی) بود که در آن ۴-۳ ریزنمونه قرار داشت. فاکتورها شامل 2,4-D با غلظت‌های صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و TDZ با غلظت‌های صفر، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر بودند. کشت‌ها هر چهار هفته در محیط کشت‌های مشابه واکشت گردیدند و یادداشت‌برداری صفت‌های کیفیت کالوس (به‌صورت امتیازدهی کیفی)، کمیت کالوس و قهوه‌ای شدن برگ هرماه یک‌بار انجام شد. پتری‌دیش‌های حاوی ریزنمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفتند و پس از یک ماه به نور منتقل شدند.

جدول ۱- ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت آزمایش اول (میلی‌گرم در لیتر)

شماره تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
2,4-D	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳
TDZ	۰	۱	۲	۴	۰	۱	۲	۴	۰	۱	۲	۴	۰	۱	۲	۴

آزمایش دوم

در آزمایش دوم که روی جوانه‌ی گردو انجام شد، قطعات جوانه پس از استریل، به شیشه حاوی محیط کشت DKW به‌صورت عمودی انتقال یافت. در این آزمایش ۱۶ تیمار متفاوت (جدول ۲) در یک آزمایش فاکتوریل دو فاکتوره، با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. هر تکرار شامل یک شیشه حاوی محیط کشت بود که در آن یک ریزنمونه قرار داشت. فاکتورها شامل BAP با غلظت‌های صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت‌های صفر، ۰/۰۱، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بودند. کشت‌ها هر چهار هفته در محیط کشت‌های مشابه واکشت گردیدند و یادداشت‌برداری میزان اندام‌زایی ریزنمونه جوانه هرماه یک‌بار انجام شد. ریزنمونه‌های کشت‌شده در اتاق رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفتند و پس از یک ماه به نور منتقل شدند.

جدول ۲- ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت آزمایش دوم (میلی‌گرم در لیتر)

شماره تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
BAP	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳	۳
IBA	۰	۰/۰۱	۱	۲/۵	۰	۰/۰۱	۱	۲/۵	۰	۰/۰۱	۱	۲/۵	۰	۰/۰۱	۱	۲/۵

نتایج و بحث

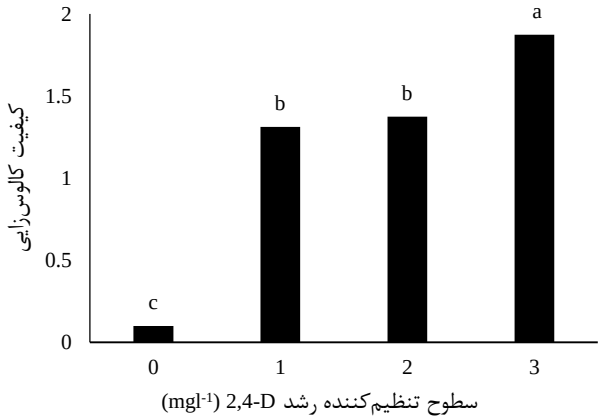
آزمایش اول

پس از گذشت ۶ هفته از کشت قطعات برگ جوان در آزمایش اول، القاء کالوس روی قطعات برگ کشت‌شده مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد 2,4-D بر کیفیت و کمیت کالوس‌زایی در برگ گردو نشان داد در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). بیشترین کیفیت کالوس‌زایی (شکل ۲) و همچنین بیشترین کمیت کالوس‌زایی (شکل ۴) در سطح ۴ هورمون 2,4-D که حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر بود مشاهده شد (شکل ۶). بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تأثیر غلظت‌های مختلف رشد TDZ بر کیفیت کالوس‌زایی، دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۳). بیشترین کیفیت کالوس‌زایی در سطح ۱ هورمون TDZ، که صفر میلی‌گرم در لیتر بود، مشاهده شد (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر قهوه‌ای شدن کالوس نشان داد اثر متقابل بین سطوح 2,4-D و TDZ در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است (جدول۳). تیمار 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر (شکل ۵) و تیمار TDZ به میزان ۴ میلی‌گرم در لیتر (شکل ۷-الف) بیشترین میزان قهوه‌ای شدن برگ را به همراه داشته‌اند. کمترین میزان قهوه‌ای‌شدن برگ نیز در تیمار حاوی هورمون 2,4-D (بدون وجود هورمون TDZ) به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۷-ب).

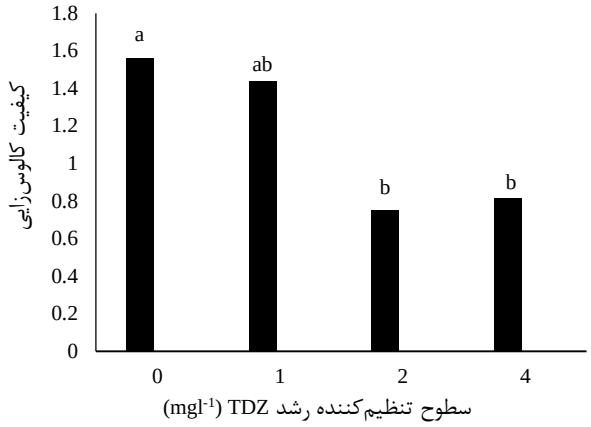
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و TDZ بر کیفیت، کمیت و قهوه‌ای‌شدن کالوس در کشت برگ گردو رقم چندلر

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کیفیت کالوس	کمیت کالوس	قهوه‌ای‌شدن
2,4-D	۳	۱۰/۲۶۶*	۱۶/۲۶۶*	۳/۱۸۸ ns
TDZ	۳	۲/۸۰۷*	۱/۵۵۷ ns	۳/۷۲۹ ns
2,4-D×TDZ	۹	۱/۳۰۷ ns	۰/۹۱۸ ns	۳/۴۶۵*
خطا	۴۸	۰/۸۴۹	۱/۰۸۹	۱/۴۱۷

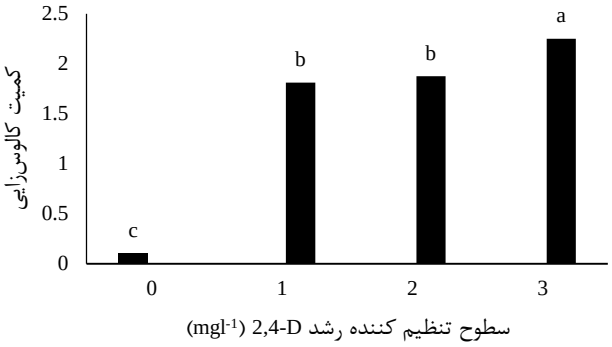
ns و * به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪



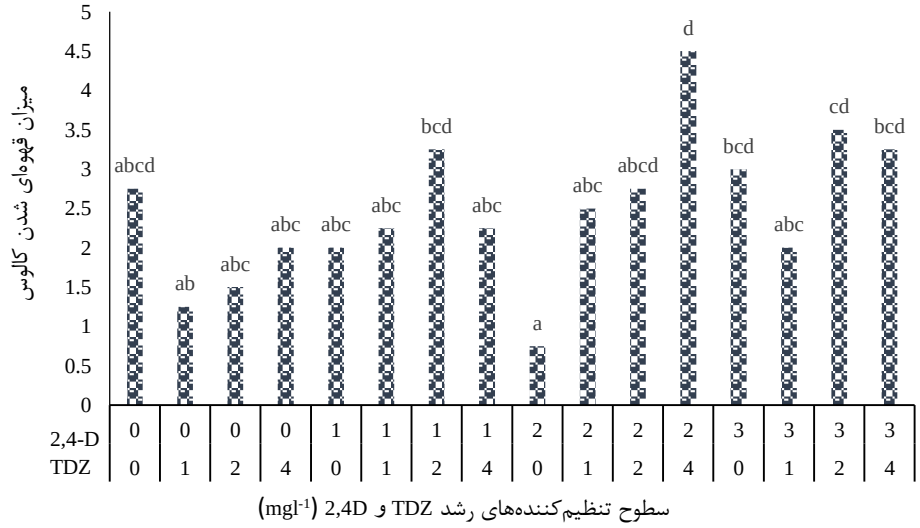
شکل ۲- مقایسه اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2,4-D بر کیفیت کالوس‌زایی برگ گردو با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪



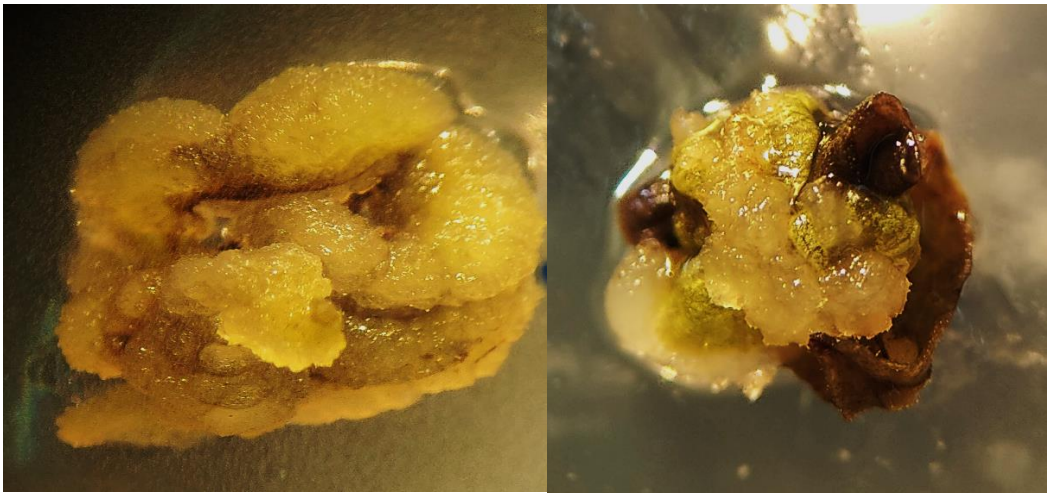
شکل ۳- مقایسه اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد TDZ بر کیفیت کالوس‌زایی برگ گردو با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪



شکل ۴- مقایسه اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2,4-D بر کمیت کالوس‌زایی برگ گردو با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و TDZ بر میزان قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه برگ گردو



شکل ۶- القاء کالوس در برگ گردو در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

شکل ۷- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه برگ گردو
الف) محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ
ب) محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدون حضور TDZ

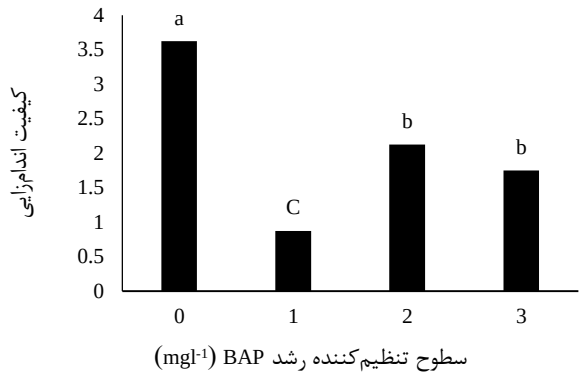
آزمایش دوم

در آزمایش دوم که روی جوانه گردو انجام شد، پس از گذشت سه هفته از کشت قطعات جوانه، اندام‌زایی صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر اندام‌زایی جوانه نشان داد بین سطوح BAP و IBA و همچنین اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). بیشترین میزان اندام‌زایی، در سطح ۱ هورمون BAP (صفر میلی‌گرم در لیتر) و سطح ۳ هورمون IBA (۱ میلی‌گرم در لیتر) صورت گرفت (شکل‌های ۸ و ۹). نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر اندام‌زایی جوانه نشان داد اثر متقابل بین سطوح IBA و BAP در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است (جدول ۴). بیشترین میزان اندام‌زایی از ریزنمونه جوانه در تیمار حاوی ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون حضور BAP بود (شکل‌های ۱۰ و ۱۱). همچنین کالوس‌زایی جوانه در محیط کشت DKW حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (شکل ۱۲).

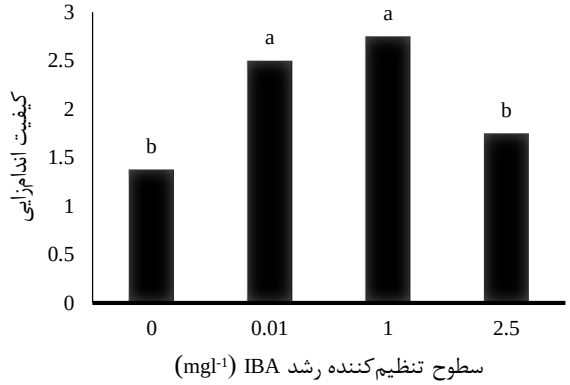
جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و IBA بر اندام‌زایی جوانه گردو رقم چندلر

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		اندام‌زایی
BAP	۳	۱۰/۵۳۱*
IBA	۳	۳/۲۸۱*
BAP×IBA	۹	۸/۴۲۰*
خطا	۱۶	۰/۳۴۴

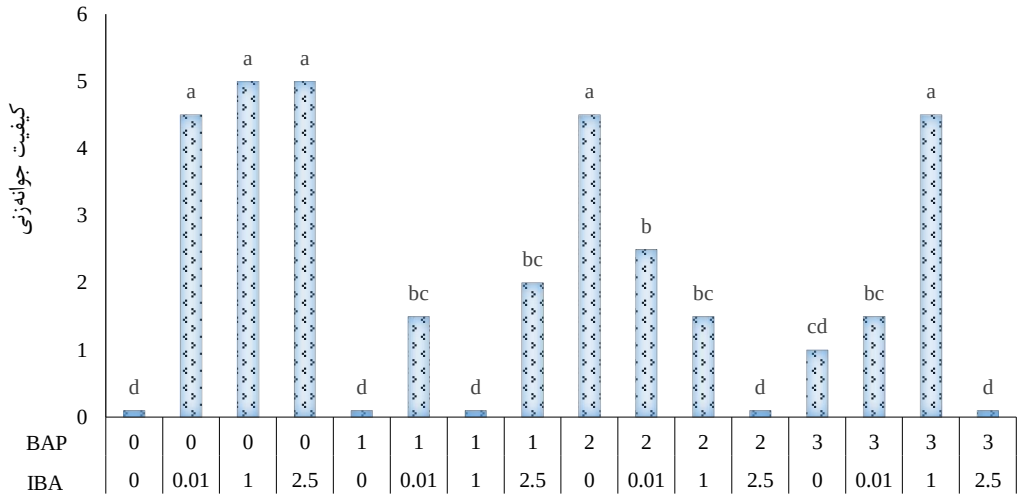
ns و * به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪



شکل ۸- مقایسه اثر سطوح تنظیم‌کننده رشد BAP بر اندام‌زایی جوانه گردو با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪

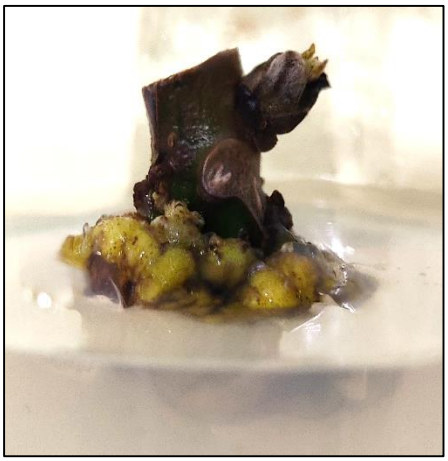


شکل ۹- مقایسه سطوح تنظیم‌کننده رشد IBA بر اندام‌زایی جوانه گردو با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد BAP و IBA بر اندام‌زایی ریزنمونه جوانه گردو رقم چندلر

شکل ۱۱- اندام‌زایی جوانه گردو در محیط کشت حاوی ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA



شکل ۱۲- کالوس‌زایی جوانه در محیط کشت DKW حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

اکسین‌ها به‌خصوص 2,4-D در تشکیل کالوس نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکنین‌ها نیز در غلظت‌های بالا منجر به تشکیل جوانه شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌نمایند (DeKlerk, 2006). Hohtola (1988) گزارش کرده است کالوس در محیط کشت دارای اکسین و فاقد سیتوکینین، تولید می‌گردد ولی بدون حضور اکسین کالوس تولید نمی‌شود. در گردو نیز گزارش شده بدون وجود اکسین در محیط کشت، کالوس تولید نمی‌گردد (Rodriguez *et al.*, 1989). بااین‌حال، در بعضی موارد حضور هم‌زمان اکسین و سیتوکینین باعث افزایش تولید کالوس می‌شود (Ahmad *et al.*, 2011). افزایش میزان 2,4-D در حضور حداقل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ با تحریک کالوس‌ها همراه بوده است (Yeung, 1995). Chawla (2011) نشان داد استفاده از یک سیتوکینین در مقدار کم همراه با اکسین می‌تواند اثرات بیش از حد اکسین را کاهش دهد. کاربرد 2,4-D به‌تنهایی یا در ترکیب با سیتوکینین، بیشترین تأثیر را در القای کالوس دارد (Elaleem *et al.*, 2009). Khatun و همکاران (۲۰۰۳) از 2,4-D به‌تنهایی برای القای کالوس و همچنین دریافت بهترین نتیجه استفاده کردند، اما در آزمایش آن‌ها غلظت 2,4-D، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. تولید کالوس در محیط کشت MS بدون 2,4-D موفقیت‌آمیز نبود و این نشان می‌دهد وجود 2,4-D برای القای کالوس لازم است. اکسین 2,4-D به‌تنهایی و در ترکیب با سیتوکینین به‌طور گسترده‌ای برای بالا بردن القای کالوس و حفظ و نگهداری آن استفاده شده است (Castillo *et al.*, 1998). گزارش شده است کالوس‌زایی در ریزنمونه‌ها با افزایش میزان اکسین و بالا رفتن نسبت اکسین به سیتوکینین نسبت مستقیم دارد (Baskaran and Jayabalan, 2006). در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد غلظت متوسط تا بالای اکسین‌ها برای تولید کالوس در گردو ضروری می‌باشد. همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد سایتوکینینی TDZ با غلظت کمتری نسبت به اکسین‌ها موردنیاز هستند و گاهی اثر منفی در تولید کالوس به همراه خواهند داشت. قهوه‌ای شدن به دلیل تغییرات فیزیولوژیک درون بافت‌های کشت‌شده رخ می‌دهد که منجر به قهوه‌ای شدن تدریجی و سرانجام مرگ بافت می‌شود. قهوه‌ای شدن بافت در اثر ترشح مواد پلی‌فنلی به محیط از محل برش و سپس اکسیدشدن آن‌ها به‌وسیله‌ی آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز صورت می‌گیرد. در مرحله اول موادی به نام کوئینین‌ها تشکیل می‌شوند که برای بافت سمی می‌باشد و در نهایت، این مواد به ملانین‌ها که رنگ قهوه‌ای تیره یا سیاه دارند، تبدیل می‌شوند (Al-Khayri and Naik, 2017). عوامل متعددی منجر به افزایش قهوه‌ای شدن بافت در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود. از جمله این عوامل نور و سطح بالای تنظیم‌کننده‌های رشد سنتتیک مانند 2,4-D و BAP می‌باشد (Baharan *et al.*, 2015). با وجود این‌که Daneshvar Hossini و همکاران (۲۰۱۰) غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP را روی تعداد و طول نوساقه‌های Gisela 6 مؤثر دانسته‌اند، Demiral و Ülger (۲۰۰۸) گزارش کردند در تکثیر پایه رویشی Gisela 5 بیشترین تعداد نوساقه (۲/۹۳) و طول آن‌ها (۱/۶۸ سانتی‌متر) به ترتیب از ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌علاوه ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌علاوه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. نتایج حاصل‌شده از پژوهش حاضر تا حدودی با نتایج Bangaru Naiduو همکاران (۲۰۱۰) و Das و همکاران (۲۰۰۸) نیز هم‌راستا بود. در مطالعه‌ی Mahdavian و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شد عدم حضور BAP در محیط سبب استقرار ریزنمونه می‌گردد و تعداد شاخه‌ها در محیط کشت حاوی سطوح بالای BAP نسبت به سطوح کم آن به‌طرز معنی‌داری بیشتر است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مقایسه میانگین داده‌های آزمایش اول نشان داد بیشترین تعداد کالوس‌زایی برگ گردو در محیط کشت DKW حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر2,4-D و بیشترین میزان قهوه‌ای‌شدن برگ را تنظیم‌کننده رشد 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه تیمار TDZ به میزان ۴ میلی‌گرم در لیتر به همراه داشته‌اند. نتایج آزمایش دوم روی جوانه گردو نشان داد بیشترین میزان اندام‌زایی به‌ترتیب در محیط کشت DKW حاوی ۲/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون BAP بود. علاوه‌براین، کالوس‌زایی جوانه در محیط کشت DKW حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت‌های مالی از این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع

Elaleem, K.G.A., Modawi, R.S. and Khalafalla, M.M. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 8(11): 2529-2534.

Ahmad, N., Fazal, H., Zamir, R., Khalil, S.A. and Abbasi, B.H. 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of Stevia rebaudiana (Bert.). Sugar Tech, 13(2): 174-177.

Al-Khayri, J.M. and Naik, P.M. 2017. Date palm micropropagation: Advances and applications. Ciência e Agrotecnologia, 41(4): 347-358.

Aniel Kumar, O., Tata, S.S. and Rupavati, T. 2010. In vitro induction of callusogenesis in chilli peppers (*Capsicum annum* L.). Current Research, 3: 42-45.

Bagheri, A. and Saffari, M. 2009. In vitro culture of higher plants. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. 406P. (In Persian).

Baharan, E., Mohammadi, P.P., Shahbaziand, E. and Hosseini, S.Z. 2015. Effects off some plant growth regulators and light on callus induction and explants in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro leaves culture. Plant Physiology, 5(4): 1473-1481. (In Persian).

Naidu, T.B., Rao, S.N., Mani, N.S., Mohan, Y.J. and Pola, S. 2010. Conservation of an endangered medicinal plant Centella asiatica through plant tissue culture. Drug Invention Today, 2(1): 17-21.

Baskaran, P. and Jayabalan, N. 2006. In vitro mass propagation and diverse callus orientation on *Sesamum indicum* L. an important oil plant. Agricultural Technology, 2(2): 259-269.

Castillo, A.M., Egana, B., Sanz, J.M. and Cistue, L. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Reports, 17(11): 902-906.

Chawla, H. 2011. Introduction to plant biotechnology. CRC Press.

Daneshvar Hossini AR, Ganji Moghadam E, Anahid S. 2010. Effects of media cultures and plant growth regulators in micro propagation of Gisela 6 rootstock. Ann Biol Res.; 1(2): 135-141.

Hossini, A.D., Moghadam, E.G. and Anahid, S. 2010. Effects of media cultures and plant growth regulators in micro propagation of Gisela 6 rootstock. Annals of Biological Research, 1(2): 135-141.

Das, R., Hasan, M.F., Hossain, M.S. and Rahman, M. 2008. Micropropagation of *Centella asiatica* L. an important medicinal herb. Progressive agriculture, 19(2): 51-56.

DeKlerk, G.J. 2006. Plant hormone in tissue culture. Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemical, 17-25p.

Demiral, S. and Ülger, S. 2008. A research on propagation of Gisela 5 cherry rootstock by tissue culture. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21(1): 117-121.

FAO. 2020. https://www.fao.org/faostat/en/#data.

Hohtola, A. 1988. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 15(3): 211-222.

Khatun, N., Bari, M.A., Islam, R., Huda, S., Siddque, N.A., Rahman, M.A. and Mullah, M.U. 2003. Callus induction and regeneration from nodal segment of potato cultivar Diamant. Biological Sciences, 3: 1101-1106.

Mahdavian, M., Bouzari, N. and Abdollahi, H. 2010. Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative Mahlab rootstock (SL-64). Seed and Plant Improvement, 1: 1-26.

Mojtahed, J. 2016. Walnut book. Ministry of Jihad Agriculture, Deputy Minister of Horticulture, Office of Cold and Dried Fruits.168p. (In Persian).

Nissen, S.J. and Sutter, E.G. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. HortScience, 25(7): 800-802.

Rodriguez, R., Revilla, A., Albuerne, M. and Perez, C., 1989. Walnut (Juglans spp.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, 5: 99-126.

Vahdati, K. and Khalighi, A. 1999. Persian walnut stooling in Iran. In IV International Walnut Symposium, 544: 527-530.

Vahdati, K. and Mojtahed, J. 2006. Nursery management and grafting of walnut. Khaniran Publications, 17p. (In Persian).

Yeung, E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In Vitro Embryogenesis in Plants, 20 :205-247.

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**

Vol. 3, No. 2, Autumn & Winter 2022, p. 305-316 **جلد ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحه ۳۱۶-۳۰۵**

Research Article DOI: 10.34785/J020.2022.011

Effect of plant growth regulators on callogenesis and organogenesis in walnut (*Juglans regia* L.) cultivar Chandler

Kosar Shirali[1], Payam Pour Mohammadi*[2], Khalil Alami Saeid[3]

1. MSc. graduate, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2. Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received: 21-05-2022

Accepted: 21-08-2022

Abstract

Walnut (*Juglans regia* L.) of the walnut family (Juglandaceae) is one of the most important edible species among dry fruits. In order to determine the best callus and organogenesis treatment on walnut leaf and bud explants in the DKW culture medium, a factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design. In the first experiment, leaf explants were cultured in DKW medium, the first factor was 2,4-D (0, 1, 2, 3 mg/l), and the second factor was TDZ (0, 1, 2, 4 mg/l). In the second experiment, which was performed using bud explants, BAP growth regulator with concentrations of 0, 1, 2, 3 mg/l and IBA with 0, 0.01, 1, 2.5 mg / l were used. In the first experiment, the results showed that the highest number of callogenesis occurs in DKW medium containing 3 mg/l 2.4-D and the highest number of leaf browning occurs in medium containing 2 mg/l 2,4-D and 4 mg/l TDZ. In the second experiment, the highest rate of organogenesis was observed in a culture medium containing 1 mg/l IBA without BAP. The results of this study showed that there is a possibility of callus formation from leaf explants in DKW medium containing 3 mg 2,4-D and organogenesis of bud explants in DKW medium containing 1 mg/l. Also in the treatment containing 2 mg/l BAP and 1 mg/l IBA callus formation of walnut germ explants was observed.

Keywords: Auxin, organogenesis, cytokinine, callus formation, walnut

*Corresponding Author Email: Mohamadi@Asnrukh.ac.ir