بررسی اثر برخی از تنظیم کننده های رشد و مواد آلی نیتروژن دار بر رشد شاخه گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه ای

کورش وحدتی ، احمد خلیقی ، روح انگیز نادری و احمد مجد

بترتیب دانشجوی دوره دکتری ، دانشیار ، مربی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی

دانشگاه تهران و دانشیار دانشکده علوم

دانشگاه تربیت معلم تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۷/۷/۸

خلاصه

به منظور بررسی امکان افزایش سرعت رشد شاخه گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در شرایط درون شیشه ای، اثر هورمونهای ٦ - بنزیل آمینو پورین[1] (BAP) و ایندول بوتیریک اسید[2] (IBA) و تعدادی از مواد آلی نیتروژن دار طی دو آزمایش مختلف مورد بررسی قرار گرفت . در آزمایش اول که در قالب طرح آماری فاکتوریل در پایه کاملا" تصادفی انجام شد ، از سه غلظت صفر ، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ mg/l هورمون IBA و چهار غلظت ۰/۵ ، ۱ ، ۱/۵ و ۲ mg/l هورمون BAP در محیط کشت تخصصی DKW[3] استفاده شد .نتایج حاصله پس از دوماه نشان داد که اکثر شاخصهای رشد ریزنمونه ها در غلظتهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین مقدار خود را نشان می دهند و افزایش غلظت این هورمون بیش از مقادیر فوق سبب کوچکتر شدن برگها و کم شدن تعداد و طول آنهامی شود. افزایش غلظت IBA از صفر تا ۰/۰۵ mg/l نیز سبب کاهش تمامی شاخصهای رشد شاخه شد. در آزمایش دوم که در قالب طرح آماری کاملا" تصادفی انجام شد ، اثرافزودن عصاره مخمر[4] (g/l I) ، کازئین هیدرولیزات[5] (g/l ۰/۵) ، مخلوط کازئین هیدرولیزات و عصاره مخمر (g/l ۰/۵ + ۱) و پودر موز[6] (g/l ۳۰) در محیط کشت پایه DKW (دارای IBA ۰/۰۱ mg/l و BAP ۱ mg/l) بر شاخه زایی ریز نمونه ها بررسی شد. نتایج نشان داد که افزودن این مواد به تیمارهای مختلف در ۱۰ روز اول ، میزان رشد را به طور ناگهانی افزایش می دهد ولی پس از آن سبب قهوه ای شدن بافت و کاهش رشد شاخه نسبت به شاهد می شود .

واژه‌های کلیدی : گردوی ایرانی ، رشد شاخه ، کشت درون شیشه ای ، IBA ، BAP، عصاره مخمر ، کازئین هیدرولیزات و پودر موز

مقدمه

انجام پژوهش بر روی ریز ازدیادی گردوی ایرانی در جهت تولید گیاهان یکنواختی که به طور غیر جنسی تکثیر یافته اند ، یکی از موضوعاتی است که در دهه اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است . یکی از مهمترین مراحل این تکنیک ، مرحله رشد شاخه است . به طوری که افزایش آن در شرایط درون شیشه‌ای نه تنها می‌تواندمنجر به کوتاه شدن فرآیند ریز ازدیادی یک گیاه شود ، بلکه مواد گیاهی بیشتری را نیز برای انتقال به سایر مراحل

1 - 6-Benzylaminoppurine

2 - Indole butyric acid

3 - Driver & Kuniynki walnut medium (DKW)

4- Yeast Extract

5 - Cazein Hydrolysate

6- Banana Powder

فراهم می کند.

یکی از عمده ترین مشکلات ریز ازدیادی گردو از طریق کشت بافت ، مقدار و سرعت کم تکثیر آن می باشد (۲،۳ و ۴) . وجود مواد پلی فنلی نظیر ژوگلان [1] در بافتهای گردو ، که موجب کاهش تقسیم سلولی می شود ، نه تنها امکان تکثیر غیر جنسی آن به طرق سنتی را با مشکل مواجه ساخته است بلکه استقرار و رشد این گیاه در شرایط درون شیشه ای را نیز تحت تاثیر قرار داده است .

چالوپا موفق به تکثیر شاخه های حاصل از کشت ریز نمونه های بدست آمده از دانهالهای ۲ تا ۴ ماهه روی محیط کشت MS [2] حاوی هورمونهای BAP , NAA [3] شد . رادریگوئز (۱۴) موفق به تکثیر شاخه‌ازمحورهای جنینی شد.درایور و کانیوکی (۷) موفق شدند با ارائه محیط کشت DKW که حاوی هورمونهای BA و IBA بود، در مدت زمان کمتری شاخه های یکنواختری را بدست آوردند. در سال ۱۹۸۸ تغییر روشهایی که برای کشت بافتهای نونهال به کار می رفت ، منجر به ریز ازدیادی موفق ریز نمونه ها ی بالغ گردوی ایرانی شد (۱۱).

علاوه بر نقش بسیار مهم مواد تنظیم کننده رشد در شاخه زایی ، گروهی از مواد آلی نیتروژن دار که غالبا" دارای ترکیبات ناشناخته ای هستند نیز بر روی تقسیم سلولی و رشد مؤثرند. این مواد شامل عصاره مخمر، شیره نارگیل، کازئین هیدرولیزات ، عصاره‌بلوط، عصاره ذرت ، پودر موز و غیره هستند (۱).

با توجه به اطلاعات موجود در زمینه عوامل مؤثر بر شاخه زایی گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه ای، در این پژوهش اثر دو تنظیم کننده مهم رشد و برخی از مواد آلی نیتروژن دار بر شاخصهای رشد شاخه مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روشها

برای انجام این آزمایشها ابتدا یکی از درختان گردوی بذری ۱۰ ساله موجود درمحوطه دانشکده کشاورزی کرج به عنوان منبع ریزنمونه انتخاب شد. برای ایجاد جوانه های جانبی والقای رشد بیشتر در شاخه ها و تولید شاخه هایی با خصوصیات نونهالی ، در زمستان سال قبل از نمونه برداری ، بر روی درخت مادری هرس شدید صورت گرفت وبرای کاهش آلودگیهای قارچی و باکتریایی با سموم اکسی کلرید مس ۳ در هزار و بنومیل ۲ در هزار سمپاشی شد (۱۰، ۱۱ و ۱۲). سپس میزان ۱۰۰ کیلوگرم کود دامی و ۵ کیلوگرم کود اوره در محل سایه انداز آن ریخته شد. از یک ماه قبل از برداشت ریز نمونه ها ، محلهای مورد نظر جهت برداشت ریزنمونه با هورمونهای BAP ۵۰ mg/l و GA3 ۱۰۰ mg/l (محلول تجارتی اگر و گیب [4]) محلولپاشی شدند (۱۳). پس از رشد شاخه های فصل جاری، جهت استقرار کشت در محیط درون شیشه ای ، در طول ماههای اردیبهشت و خرداد شاخه های در حال رشد با قطر حدود ۰/۵ سانتیمتر از پایه مادری جدا شدند (۵، ۱۱ و ۱۴). برگهای شاخه ها حذف و پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا با آب حاوی محلول شوینده تجارتی ریکا (به غلظت ۲ در هزار) شستشوشدند ، سپس به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در زیر آب روان قرار داده شدند . قطعات ریزنمونه که هریک حدود ۲-۰/۵ سانتیمتر طول داشتند و حاوی یک جوانه بودند به زیر دستگاه هوداستریل [5] انتقال داده شدند و در آنجا با استفاده از محلول کلرید جیوه ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند (۱). ریز نمونه ها ی استریل بر روی محیط کشت پایه DKW دارای mg/l ۰/۰۱ IBA و mg/l ۱ BAP که توسط g/l ۲/۴ فیتاژل [6] ژله ای شده و pH آن روی ۵/۵ تنظیم شده ودارای ۳۰ گرم ساکارز بود کشت داده‌شدند.محیط کشت‌قبلا"بمدت ۲۰ دقیقه‌دراتوکلاو با حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۰۵ اتمسفر استریل شده بود .

پس از استقرار کشتها و رشد شاخه ها از جوانه ها در این محیط کشت پایه ، دو طرح آماری برای بررسی اثر تنظیم کننده های رشد و مواد آلی نیتروژن دار به طور جداگانه ترتیب داده شد و از شاخه های حاصله به عنوان منبع ریزنمونه برای انجام آزمایشها استفاده شد.

در اولین آزمایش ، اثرات سه غلظت صفر ، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر هورمون ایندول -۳-بوتیریک اسید (IBA) و چهار غلظت ۰/۵ ، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر هورمون ۶ - بنزیل آمینوپورین (BAP) در قالب یک طرح آماری فاکتوریل در پایه کاملا" تصادفی بر رشد شاخه مورد بررسی قرار

1 - Juglone
2- Murashige & Skoog
3 - Naphthaleneacetic acid
4- Agro-gibb
5- Laminar air flow
6 - Phytagel

گرفت . پس از گذشت ۲ ماه میزان طول شاخه ، تعداد گره ، طول بزرگترین برگ ، قطر پینه تشکیل شده در انتهای ریزنمونه و شاخص رشد برگ [1] (درصد ریز نمونه ها ی دارای حداقل یک برگ × تعداد برگهای ریزنمونه × طول طویلترین برگ) اندازه گیری شد (۱۰ و ۱۴).

در آزمایش دوم مقدار ۰/۵ گرم کازئین هیدرولیزات (CH)، ۱ گرم عصاره مخمر (YE)، ۱+۰/۵ گرم مخلوط آنها (CH+YE) و ۳۰ گرم پودر موز (BP) پس از حل شدن در آب مقطر هرکدام به طور جداگانه به یک لیتر محیط DKW دارای IBA ۰/۰۱ mg/l و BAP ۱ mg/l افزوده شدند. یک لیتر محیط کشت DKW با همان مقادیر هورمونی و فاقد مواد آلی نیتروژن دار نیز به عنوان شاهد تهیه شد. اثر این ۵ تیمار در قالب یک طرح آماری کاملا" تصادفی با ۱۱ تکرار بر میزان طول شاخه ، تعداد گره (برگ) ، طول طویلترین برگ ، شاخص رشد برگ و میزان قهوه ای شدن بافت (بر اساس نمره دهی از ۱ تا ۳) بررسی شد. تمامی داده ها قبل ازانجام تجزیه واریانس با استفاده از فرمول $\sqrt{x+\frac{1}{2}}$ تبدیل شدند (۶).

نتایج و بحث

۱-۳. اثر تنظیم کننده های رشد

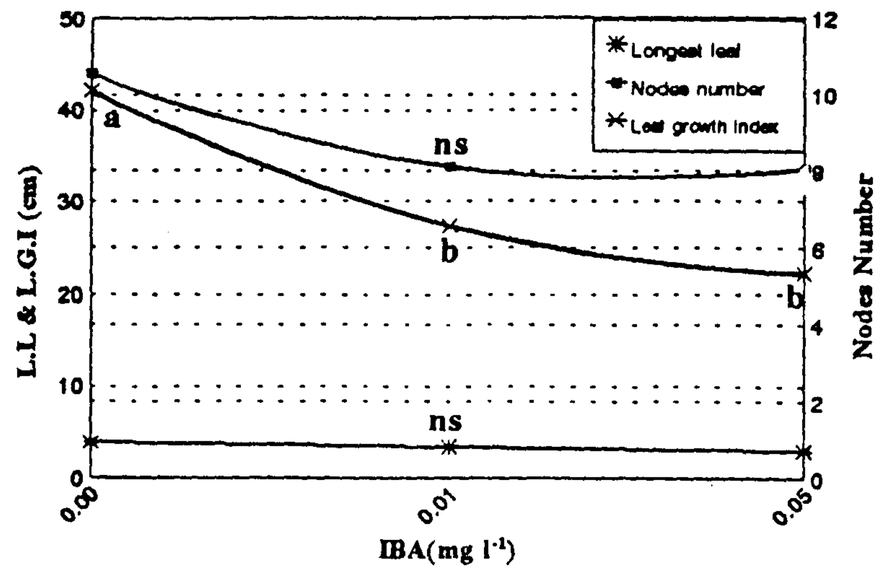
اندازه گیری و تجزیه واریانس شاخصهای رشد شاخه و برگ ریز نمونه ها پس از ۲ ماه حاکی از این است که هورمون IBA فقط بر طول شاخه و شاخص رشد برگ اثر معنی داری در سطح ۵% داشته و بر تعداد گره ، طول طویلترین برگ و قطر پینه انتهایی اثر معنی داری نداشته است . در حالی که هورمون BAP بر روی تمامی شاخصهای مورد مطالعه در سطح ۱ % اثرات معنی داری داشته است .

مقایسه میانگینها برای بررسی اثرات IBA با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵% نشان می دهد که بیشترین طول شاخه و شاخص رشد برگ در تیمار فاقد این هورمون حاصل می شود و تیمارهای IBA ۰/۰۱ mg/l و ۰/۰۵ در سطح بعدی قرار می گیرند (شکل های ۱ و ۲).

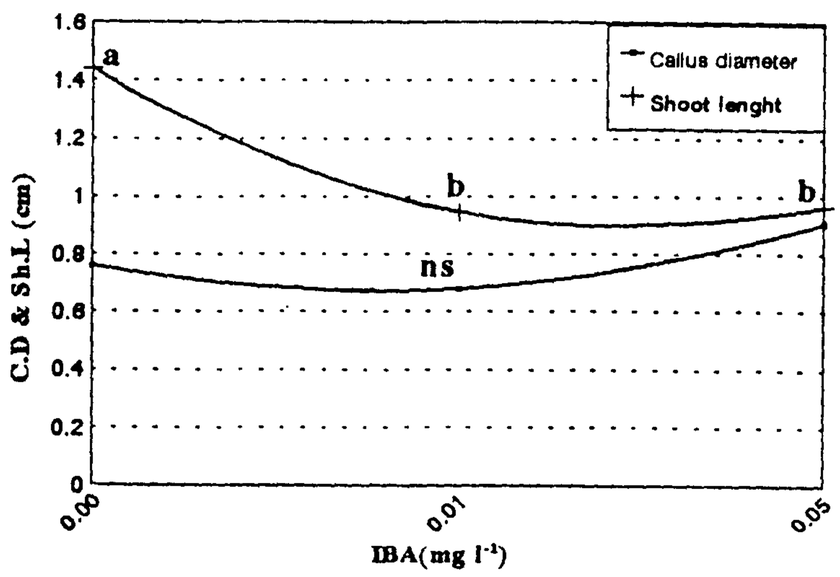
مقایسه میانگینها با آزمون چند دامنه دانکن نشان می دهد که بیشترین مقدار طول شاخه و تعداد گره در غلظتهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP حاصل شده است و اثرات این دو غلظت از نظر آماری در یک‌سطح قراردارند و اثر غلظتهای ۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP برروی طول شاخه و تعداد گره در سطح بعدی قرار گرفته اند (شکل های ۳ و ۴).

هورمون BAPدر غلظت یک میلی گرم در لیتر سبب تولید بیشترین مقدار پینه در انتهای ریزنمونه شد و افزایش غلظت آن از ۰/۵ تا ۲ میلی گرم در لیتر سبب کوچکتر شدن برگها گردید. به طوری که کوچکترین اندازه برگها در غلظت ۲میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد. در نهایت ، بیشترین مقدار شاخص رشد برگ که در حقیقت در برگیرنده اکثر شاخصهای فوق است در غلظتهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد و غلظتهای کمتر و بیشتر از این حد (۰/۵ mg/l و ۲) سبب کاهش مقدار این شاخص شدند.

اثرات متقابل هورمونهای IBA و BAP فقط در سطح ۵% بر روی شاخص رشد برگ معنی دار بود ، به طوری که

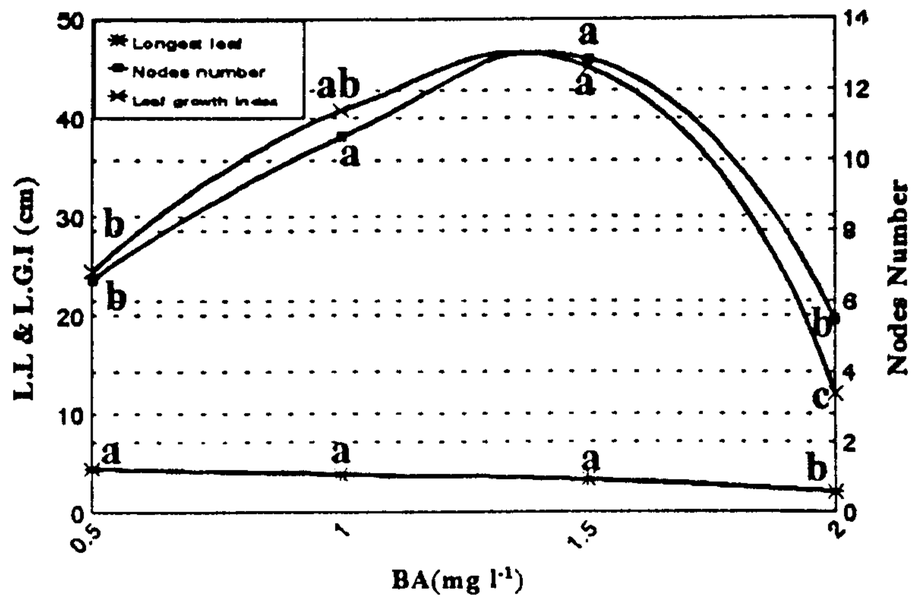


شکل ۱ - اثر غلظت های مختلف هورمون IBA برروی طول طویلترین برگ، تعداد گره و شاخص رشد برگ.

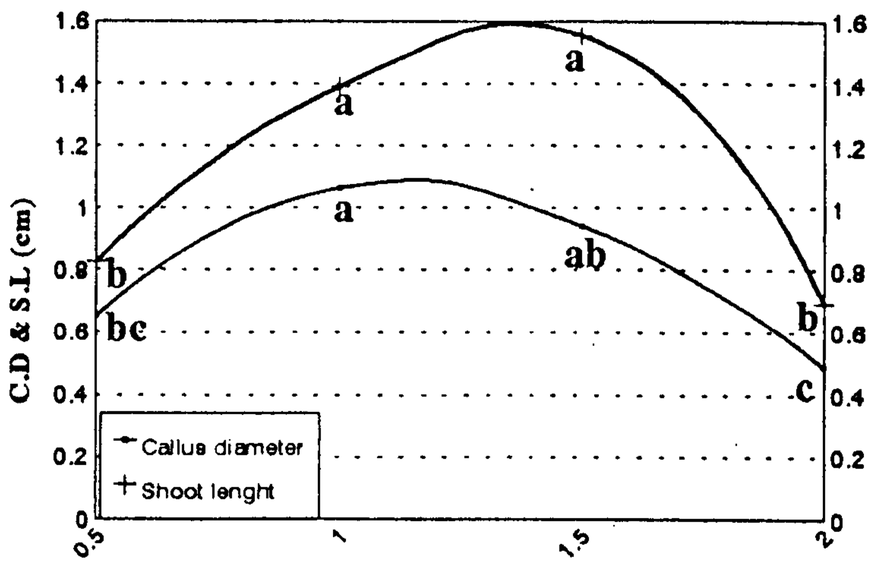


شکل ۲ - اثر غلظت های مختلف هورمون IBA بر روی قطر پینه قاعده ریزنمونه و طول شاخه.

1 - Leaf Growth Index



شکل ۳ - اثر غلظت های مختلف هورمون BA بر روی طول طویلترین برگ، تعداد گره و شاخص رشد برگ.



شکل ۴ - اثر غلظت های مختلف هورمون BA بر روی قطر پینه قاعده ریزنمونه و طول شاخه.

در تمامی غلظتهای IBA افزایش غلظت BAP تا ۱/۵ میلی گرم در لیتر سبب افزایش شاخص برگ می شود ولی غلظتهای بالاتر از آن (۲ mg/l) سبب کاهش این شاخص می گردد (شکل ۵).

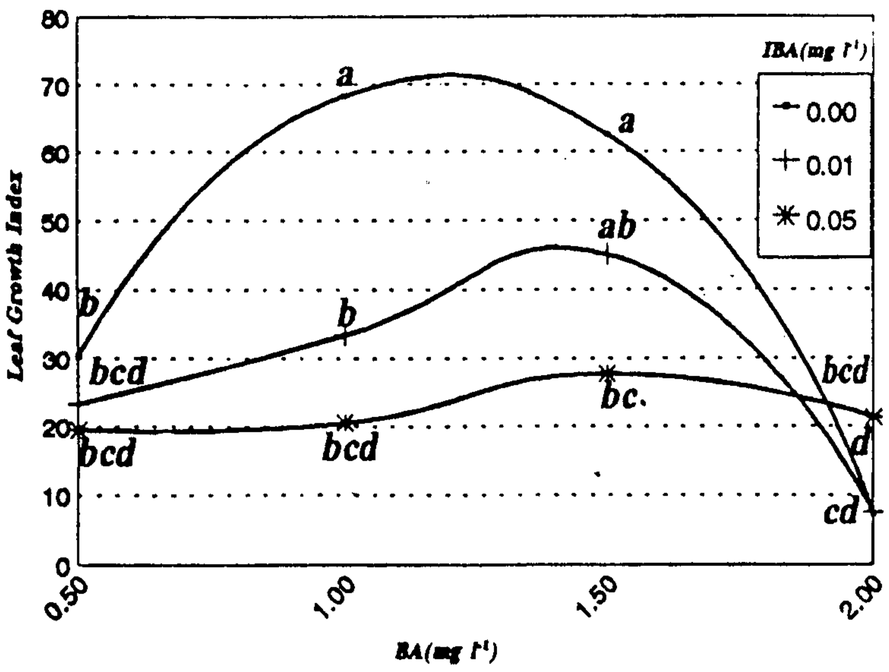
اگر چه چالوپا (۵) با استفاده از هورمونهای NAA (mg/l ۱/۶-۰/۵۴) و BAP (mg/l ۰/۶-۰/۱) در محیط کشت پایه MS موفق به شاخه زایی شد ، ولی درایور و کانیوکی (۷) و مک گراناهان و همکاران (۱۱) و هوزا و همکاران (۹) موفق شدند در محیط کشت پایه DKW دارای BAP (۱mg/l) و IBA (mg/l ۰/۰۱) بهترین رشد شاخه را بدست آورند . تارازو و همکاران(۱۵) نیز تحت همان شرایط ، فقط باتغییر غلظت IBA به mg/l ۰/۱بیشترین طول و تعداد شاخه را بدست آوردند . همان طور که شرح داده شد در این آزمایش نیز بیشترین میزان اکثر شاخصهای رشد شاخه در غلظتهای ۱ mg/l و ۱/۵ BAP بوده است و افزایش غلظت این هورمون نه تنها سبب افزایش رشد شاخه نشده است بلکه منجر به کوچکتر شدن برگها و کم شدن تعداد وطول آنها گردیده است . افزایش غلظت IBA از صفر تا ۰/۰۵ mg/l سبب کاهش کلیه شاخصهای رشد شده است و به بیان بهتر هورمون IBA هیچ نقش مثبتی در شاخه زایی نداشته است ، که از این نظر نتایج ما با نتایج سایر محققین تفاوت دارد . با توجه به شرایطی که برای پژوهش حاضر به کار گرفته شده است ، تصور می شود این اختلاف در نتایج مربوط به اختلاف در تواناییهای ژنتیکی - فیزیولوژیکی گیاهان والد و به احتمال زیاد بیوسنتز مقدار کافی اکسین درون زا باشد (شکل ۶).

۲-۳. اثر مواد آلی نیتروژن دار

اثرات مواد آلی نیتروژن دار بر روی میزان شاخصهای رشد شاخه و قهوه ای شدن بافتها دوماه پس از اولین کشت مورد بررسی قرار گرفت. تمامی ریز نمونه ها در تیمارهای دارای CH + YE و YE در اثر قهوه ای شدن بافت از بین رفته بودند. لذا بررسی میزان شاخصهای رشد ، فقط در تیمارهای شاهد (DKW), CH و BP صورت پذیرفت. در ضمن از آنجاکه در این تیمارها نیز تعدادی از تکرارها در اثر آلودگی از بین رفته بودند ، تعداد تکرار این تیمارها از ۱۱ به ۵ تقلیل داده شد. البته در مورد میزان قهوه ای شدن بافت، این صفت به طور جداگانه و با همان ۱۱ تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که از نظر تمامی صفات (طول شاخه ، تعداد گره ، طول طویلترین برگ ، شاخص رشد برگ و میزان قهوه ای شدن بافت) در سطح ۱% اختلاف معنی داری بین تیمارها وجود دارد.

مقایسه میانگینها با آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که



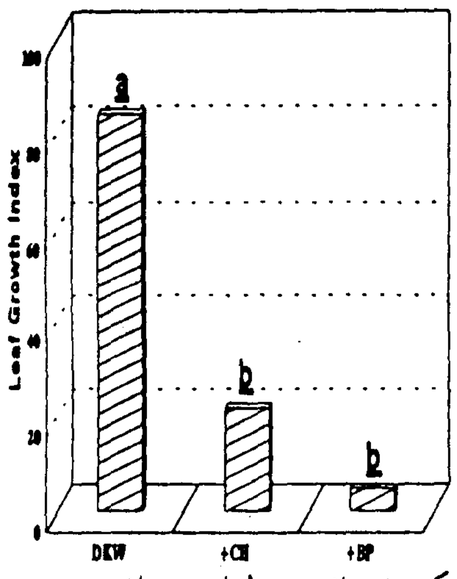
شکل ۵ - اثر متقابل غلظتهای مختلف دو هورمون IBA و BA بر روی شاخص رشد برگ.

شکل ٦ - مراحل شاخه زایی گردوی ایران در محیط کشت DKW دارای BA1 mg/l و فاقد IBA

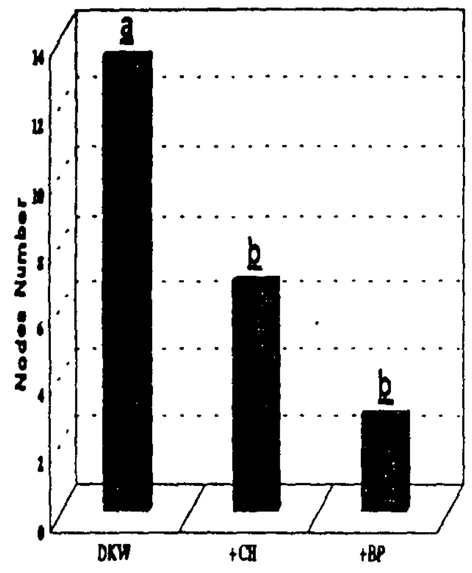
بالاترین میزان برای تمامی شاخصهای رشد شاخه و برگ در تیمار شاهد (محیط کشت DKW) حاصل شده است به طوری که در تمامی سطوح خطا به عنوان تیمار برتر شناخته شد. پس از آن از نظر طول شاخه در سطح خطای ۵% تیمارهای DKW +CH و DKW +BP به ترتیب در سطوح دوم و سوم قرار دارند . تیمارهای DKW +CH و DKW +BP از نظر صفت تعداد گره در سطح ۱% و از نظر صفات طول طویلترین برگ و شاخص رشد برگ تفاوت معنی داری نداشتند (شکل های ۷ تا ۱۰).

مقایسه میانگینها از نظر قهوه ای شدن بافت ریز نمونه ها تحت تاثیر تیمارهای مختلف نشان داد که در سطح ۱% محیطهای دارای CH+YE ، BP و YE موجب تشدید قهوه ای شدن بافت ریزنمونه ها نسبت به سایر تیمارها می شوند. محیط دارای CH+YE قهوه‌ای شدن بیشتری را نسبت به محیط دارای CH و شاهد ایجاد کرد. محیطهای دارای CH و شاهد (DKW) از این نظر در سطوح ماقبل آخر و آخر قرار گرفتند ، و به بیان بهتر محیط شاهد (DKW) کمترین قهوه‌ای شدن را در بافت ریز نمونه ها ایجاد کرد (شکل ۱۱).

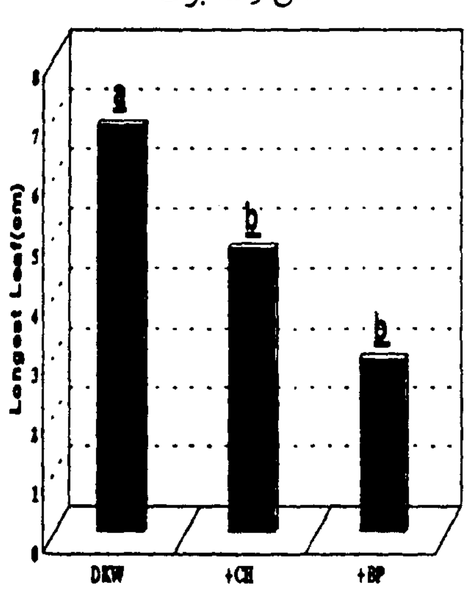
در نهایت مشخص شد که افزودن هیدرولیزات کازئین ، عصاره مخمر ، مخلوط هیدرولیزات کازئین + عصاره مخمر و یا پودر موز به ترتیب با غلظتهای ۰/۵ ، ۱، ۰/۵+۱ و ۳۰ گرم در لیتر نه تنها سبب افزایش شاخصهای رشد شاخه نمی شوند ، بلکه



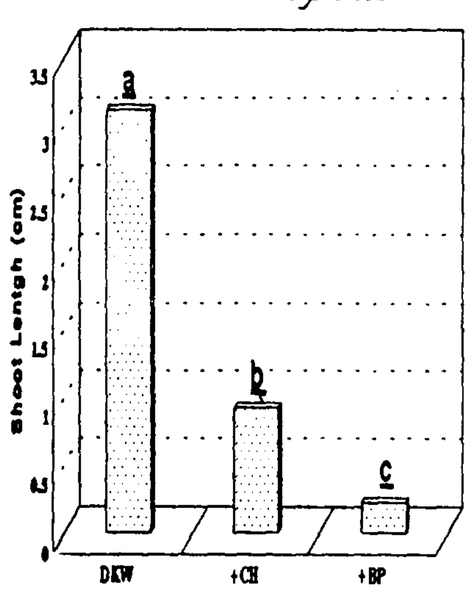
شکل ۸ - اثر محیطهای مختلف بر روی



شکل ۷ - اثر محیطهای مختلف بر روی



شکل ۱۰ - اثر محیطهای مختلف بر روی طول طویلترین برگ

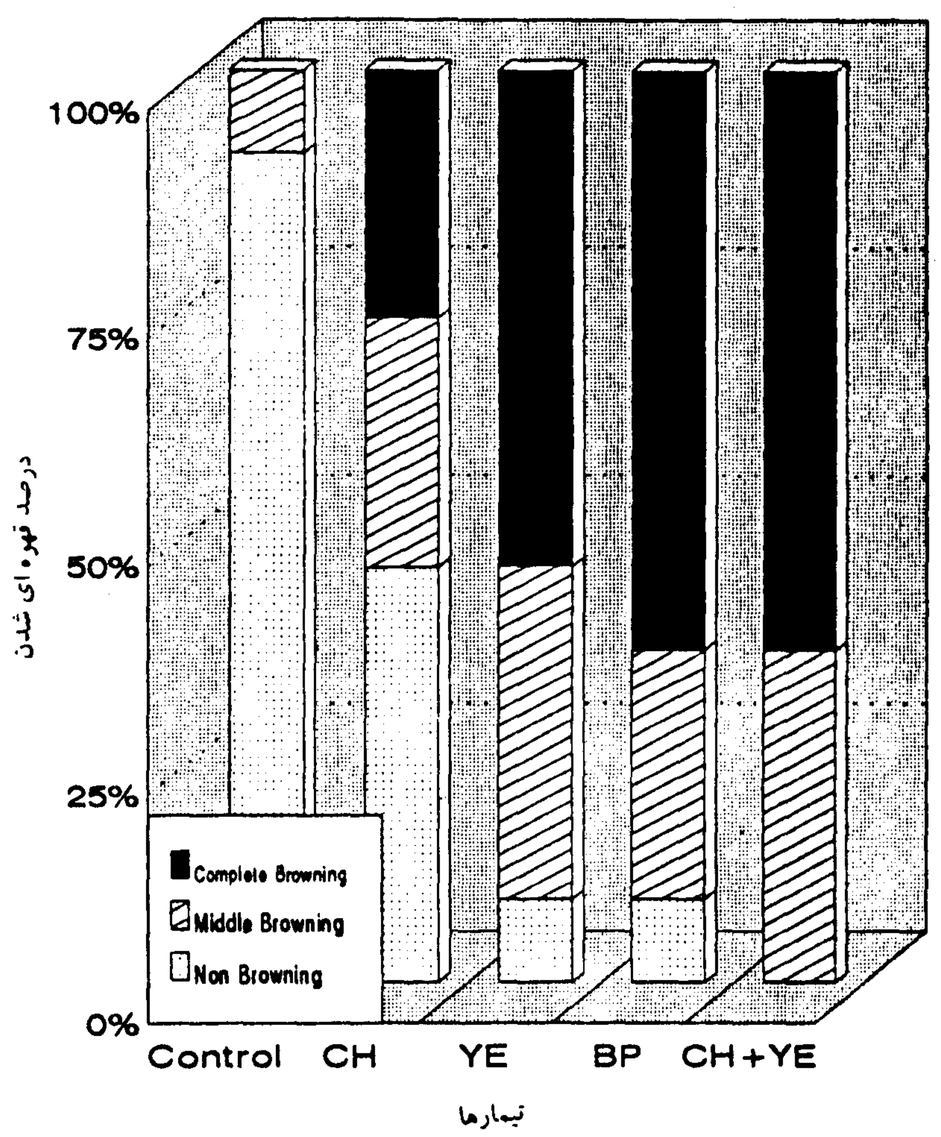


شکل ۹ - اثر محیطهای مختلف بر روی طول شاخه

ظاهرا" به دلیل بالا بودن بیش از حد غلظت مواد درمحیط کشت به صورت یک ماده بازدارنده عمل نموده و سبب کاهش رشد و افزایش قهوه ای شدن بافتها می شوند . مشاهدات عینی روند رشد شاخه ها در

محیطهای مختلف در طول ۲ ماه نشان می دهد که محیطهای دارای مواد آلی نیتروژن دار ، ابتدا سبب رشد سریعتر و ناگهانی برگهای اولیه جداکشتها شده ولی پس از مدتی در اثر قهوه ای شدن بافت ریزنمونه ، ارتباط غذایی آن با محیط کشت قطع می شود و به مرور از بین می رود؛ اما با توجه به این که در اکثر مقایسه میانگینها کازئین هیدرولیزات در مقام دوم بعد از شاهد (محیط کشت پایه DKW) قراردارد به نظر می رسد که امکان تاثیر غلظتهای پایین تر این ماده بر روی افزایش میزان رشد شاخه وجود داشته باشد.

به طور کلی چون فرمول عناصر غذایی محیط کشت DKW که برای کشت بافت گردو عرضه شده است (۷ و ۱۰) ، دارای غلظت عناصر بیشتری نسبت به سایر فرمولهای غذایی می باشد ، با توجه به نتایج این آزمایش مشاهده می شود که افزودن مواد آلی نیتروژن دار که به عنوان مکمل در برخی از فرمولهای غذایی کشت بافت کاربرد دارند ، به فرمول غذایی DKW اثرات نامطلوبی را بر ریز نمونه های گردو به جای می گذارند و بنابراین به نظر می رسد که عناصر غذایی درفرمول DKW ،به‌خصوص‌ازنظر نیتروژن، می‌توانند بخوبی احتیاجات غذایی ریزنمونه های گردو را برآورده نمایند.



شکل ۱۱ - اثر محیطهای مختلف بر روی درصد قهوه ای شدن بافت جدا کشتها

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ - خوشخوی ، م .۱۳۷۳ . فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی . ترجمه. انتشارات دانشگاه شیراز.

۲ - نادری ، ر. ۱۳۷۰. تکثیر غیر جنسی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در رابطه با مواد بازدارنده داخلی . پایان نامه کارشناسی ارشد رشته باغبانی . دانشکده کشاورزی . دانشگاه تهران .

۳ - نصیری ، م . ۱۳۷۲. بررسی روشهای تکثیر گردوی ایرانی . پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم گیاهی . دانشکده علوم . دانشگاه تربیت مدرس .

۴ - وحدتی ،ک. ۱۳۷۵. بررسی روشهای گوناگون کشت درون شیشه ای گردوی ایرانی . گزارش نهایی طرح . پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران .

5 - Chalupa, V. 1981. Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*. Comm. Inst. Forest Coch. Lett. 9:179-187.

6 - Compton, M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture. 37:217-242.

7 - Driver, J. A. & Kuniyuki A. H. 1984. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. Hort Science. 19:507-509.

8 - Gruselle, R., Badia N. Boxus Ph. 1987. Walnut micropropagation , first results. Acta Horticulturae.

212:511-515.

9 - Hoza, D., Standardi, A., Stanica, F. L. & Tudro, T. A. 1992. Preliminary data on *in-vitro* walnut culture *(Juglans regia* L.). Lucrari stiintifice , USAB, seria B. 35:51-55.

10- Mc Granahan, G. H. Driver J. A. Tulecke W. 1987. Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga JM and Durzan D. J. (eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 3. Martinus Nijhoff, Boston, 261-271.

11- Mc Granahan, G. H. Leslie, C. A. & Driver J. A. 1988. *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars. HortScience. 23:220.

12- Rathore, D. S. 1991. Walnuts. In: Mitra S. K., Rathore D. S. & Bose T. K. (eds) Temperate Fruits .Horticulture and Allied Publishers, India. 377-414.

13- Revilla, M. A., Majada, J. & Rodriguez, R. 1989. Walnut *(Juglans regia* L.) micropropagation Ann. Sci. For., 46 supp., 1495-1515.

14- Rodriguez, R., Revilla, A., Albuerne M. & Perez C. 1989. Walnut *(Jugluns spp)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. In : Bajaj Y. P. S. (ed.) Trees 2, Vol.5, Springer, Berlin Heidelberg, New York. 95-126.

15- Tarrazo, A.R., Sebastian J. I. & Revilla, M. A. 1993. Influence of the phenological state of field growth walnut buds on their *in vitro* establishment. Acta Horticulturae. 311:153-159.

Effects of Some Growth Regulators and Complementary Nitrogen Compounds on *in vitro* Shoot Proliferation of Persian Walnut

K. VAHDATI, A. KHALIGHI, R. NADERI AND A. MAJD

Postgraduate student, Associate professor and , Instructor Department of Horticulture, College of Agriculture, Tehran University and Associate professor, College of Science, Tarbiat Moallem University .

Accepted 30 Sep. 1998

SUMMARY

Two experiments were conducted to investigate the effects of different concentrations of BAP (0.5, 1, 1.5 and 2 mg/l) and IBA (0, 0.01 and 0.05 mg/l) and complementary nitrogen compounds on *in vitro* proliferation rate of *Juglans regial* L. The results showed that BAP at 1-1.5 mg/l increased growth indicies when applied with no IBA in the medium. In the second trial, adding complementary nitrogen compounds (cazein hydrolysate, yeast extract and bannana powder) to the basal medium (DKW) not only did not increase growth indicies but also caused browning of tissues .

Keywords: *Juglans regia* L., proliferation, IBA, BAP, cazein hydrolysate, yeast extract & banana powder

بررسی اثر برخی از تنظیم کننده های رشد و مواد آلی نیتروژن دار بر رشد شاخه گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه ای

کورش وحدتی ، احمد خلیقی ، روح انگیز نادری و احمد مجد

بترتیب دانشجوی دوره دکتری ، دانشیار ، مربی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی

دانشگاه تهران و دانشیار دانشکده علوم

دانشگاه تربیت معلم تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۷/۷/۸

خلاصه

به منظور بررسی امکان افزایش سرعت رشد شاخه گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در شرایط درون شیشه ای، اثر هورمونهای ٦ - بنزیل آمینو پورین[1] (BAP) و ایندول بوتیریک اسید[2] (IBA) و تعدادی از مواد آلی نیتروژن دار طی دو آزمایش مختلف مورد بررسی قرار گرفت . در آزمایش اول که در قالب طرح آماری فاکتوریل در پایه کاملا" تصادفی انجام شد ، از سه غلظت صفر ، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ mg/l هورمون IBA و چهار غلظت ۰/۵ ، ۱ ، ۱/۵ و ۲ mg/l هورمون BAP در محیط کشت تخصصی DKW[3] استفاده شد .نتایج حاصله پس از دوماه نشان داد که اکثر شاخصهای رشد ریزنمونه ها در غلظتهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین مقدار خود را نشان می دهند و افزایش غلظت این هورمون بیش از مقادیر فوق سبب کوچکتر شدن برگها و کم شدن تعداد و طول آنهامی شود. افزایش غلظت IBA از صفر تا ۰/۰۵ mg/l نیز سبب کاهش تمامی شاخصهای رشد شاخه شد. در آزمایش دوم که در قالب طرح آماری کاملا" تصادفی انجام شد ، اثرافزودن عصاره مخمر[4] (g/l I) ، کازئین هیدرولیزات[5] (g/l ۰/۵) ، مخلوط کازئین هیدرولیزات و عصاره مخمر (g/l ۰/۵ + ۱) و پودر موز[6] (g/l ۳۰) در محیط کشت پایه DKW (دارای IBA ۰/۰۱ mg/l و BAP ۱ mg/l) بر شاخه زایی ریز نمونه ها بررسی شد. نتایج نشان داد که افزودن این مواد به تیمارهای مختلف در ۱۰ روز اول ، میزان رشد را به طور ناگهانی افزایش می دهد ولی پس از آن سبب قهوه ای شدن بافت و کاهش رشد شاخه نسبت به شاهد می شود .

واژه‌های کلیدی : گردوی ایرانی ، رشد شاخه ، کشت درون شیشه ای ، IBA ، BAP، عصاره مخمر ، کازئین هیدرولیزات و پودر موز

مقدمه

انجام پژوهش بر روی ریز ازدیادی گردوی ایرانی در جهت تولید گیاهان یکنواختی که به طور غیر جنسی تکثیر یافته اند ، یکی از موضوعاتی است که در دهه اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است . یکی از مهمترین مراحل این تکنیک ، مرحله رشد شاخه است . به طوری که افزایش آن در شرایط درون شیشه‌ای نه تنها می‌تواندمنجر به کوتاه شدن فرآیند ریز ازدیادی یک گیاه شود ، بلکه مواد گیاهی بیشتری را نیز برای انتقال به سایر مراحل

1 - 6-Benzylaminoppurine

2 - Indole butyric acid

3 - Driver & Kuniynki walnut medium (DKW)

4- Yeast Extract

5 - Cazein Hydrolysate

6- Banana Powder

فراهم می کند.

یکی از عمده ترین مشکلات ریز ازدیادی گردو از طریق کشت بافت ، مقدار و سرعت کم تکثیر آن می باشد (۲،۳ و ۴) . وجود مواد پلی فنلی نظیر ژوگلان [1] در بافتهای گردو ، که موجب کاهش تقسیم سلولی می شود ، نه تنها امکان تکثیر غیر جنسی آن به طرق سنتی را با مشکل مواجه ساخته است بلکه استقرار و رشد این گیاه در شرایط درون شیشه ای را نیز تحت تاثیر قرار داده است .

چالوپا موفق به تکثیر شاخه های حاصل از کشت ریز نمونه های بدست آمده از دانهالهای ۲ تا ۴ ماهه روی محیط کشت MS [2] حاوی هورمونهای BAP , NAA [3] شد . رادریگوئز (۱۴) موفق به تکثیر شاخه‌ازمحورهای جنینی شد.درایور و کانیوکی (۷) موفق شدند با ارائه محیط کشت DKW که حاوی هورمونهای BA و IBA بود، در مدت زمان کمتری شاخه های یکنواختری را بدست آوردند. در سال ۱۹۸۸ تغییر روشهایی که برای کشت بافتهای نونهال به کار می رفت ، منجر به ریز ازدیادی موفق ریز نمونه ها ی بالغ گردوی ایرانی شد (۱۱).

علاوه بر نقش بسیار مهم مواد تنظیم کننده رشد در شاخه زایی ، گروهی از مواد آلی نیتروژن دار که غالبا" دارای ترکیبات ناشناخته ای هستند نیز بر روی تقسیم سلولی و رشد مؤثرند. این مواد شامل عصاره مخمر، شیره نارگیل، کازئین هیدرولیزات ، عصاره‌بلوط، عصاره ذرت ، پودر موز و غیره هستند (۱).

با توجه به اطلاعات موجود در زمینه عوامل مؤثر بر شاخه زایی گردوی ایرانی در شرایط درون شیشه ای، در این پژوهش اثر دو تنظیم کننده مهم رشد و برخی از مواد آلی نیتروژن دار بر شاخصهای رشد شاخه مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روشها

برای انجام این آزمایشها ابتدا یکی از درختان گردوی بذری ۱۰ ساله موجود درمحوطه دانشکده کشاورزی کرج به عنوان منبع ریزنمونه انتخاب شد. برای ایجاد جوانه های جانبی والقای رشد بیشتر در شاخه ها و تولید شاخه هایی با خصوصیات نونهالی ، در زمستان سال قبل از نمونه برداری ، بر روی درخت مادری هرس شدید صورت گرفت وبرای کاهش آلودگیهای قارچی و باکتریایی با سموم اکسی کلرید مس ۳ در هزار و بنومیل ۲ در هزار سمپاشی شد (۱۰، ۱۱ و ۱۲). سپس میزان ۱۰۰ کیلوگرم کود دامی و ۵ کیلوگرم کود اوره در محل سایه انداز آن ریخته شد. از یک ماه قبل از برداشت ریز نمونه ها ، محلهای مورد نظر جهت برداشت ریزنمونه با هورمونهای BAP ۵۰ mg/l و GA3 ۱۰۰ mg/l (محلول تجارتی اگر و گیب [4]) محلولپاشی شدند (۱۳). پس از رشد شاخه های فصل جاری، جهت استقرار کشت در محیط درون شیشه ای ، در طول ماههای اردیبهشت و خرداد شاخه های در حال رشد با قطر حدود ۰/۵ سانتیمتر از پایه مادری جدا شدند (۵، ۱۱ و ۱۴). برگهای شاخه ها حذف و پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا با آب حاوی محلول شوینده تجارتی ریکا (به غلظت ۲ در هزار) شستشوشدند ، سپس به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در زیر آب روان قرار داده شدند . قطعات ریزنمونه که هریک حدود ۲-۰/۵ سانتیمتر طول داشتند و حاوی یک جوانه بودند به زیر دستگاه هوداستریل [5] انتقال داده شدند و در آنجا با استفاده از محلول کلرید جیوه ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند (۱). ریز نمونه ها ی استریل بر روی محیط کشت پایه DKW دارای mg/l ۰/۰۱ IBA و mg/l ۱ BAP که توسط g/l ۲/۴ فیتاژل [6] ژله ای شده و pH آن روی ۵/۵ تنظیم شده ودارای ۳۰ گرم ساکارز بود کشت داده‌شدند.محیط کشت‌قبلا"بمدت ۲۰ دقیقه‌دراتوکلاو با حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۰۵ اتمسفر استریل شده بود .

پس از استقرار کشتها و رشد شاخه ها از جوانه ها در این محیط کشت پایه ، دو طرح آماری برای بررسی اثر تنظیم کننده های رشد و مواد آلی نیتروژن دار به طور جداگانه ترتیب داده شد و از شاخه های حاصله به عنوان منبع ریزنمونه برای انجام آزمایشها استفاده شد.

در اولین آزمایش ، اثرات سه غلظت صفر ، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر هورمون ایندول -۳-بوتیریک اسید (IBA) و چهار غلظت ۰/۵ ، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر هورمون ۶ - بنزیل آمینوپورین (BAP) در قالب یک طرح آماری فاکتوریل در پایه کاملا" تصادفی بر رشد شاخه مورد بررسی قرار

1 - Juglone
2- Murashige & Skoog
3 - Naphthaleneacetic acid
4- Agro-gibb
5- Laminar air flow
6 - Phytagel

گرفت . پس از گذشت ۲ ماه میزان طول شاخه ، تعداد گره ، طول بزرگترین برگ ، قطر پینه تشکیل شده در انتهای ریزنمونه و شاخص رشد برگ [1] (درصد ریز نمونه ها ی دارای حداقل یک برگ × تعداد برگهای ریزنمونه × طول طویلترین برگ) اندازه گیری شد (۱۰ و ۱۴).

در آزمایش دوم مقدار ۰/۵ گرم کازئین هیدرولیزات (CH)، ۱ گرم عصاره مخمر (YE)، ۱+۰/۵ گرم مخلوط آنها (CH+YE) و ۳۰ گرم پودر موز (BP) پس از حل شدن در آب مقطر هرکدام به طور جداگانه به یک لیتر محیط DKW دارای IBA ۰/۰۱ mg/l و BAP ۱ mg/l افزوده شدند. یک لیتر محیط کشت DKW با همان مقادیر هورمونی و فاقد مواد آلی نیتروژن دار نیز به عنوان شاهد تهیه شد. اثر این ۵ تیمار در قالب یک طرح آماری کاملا" تصادفی با ۱۱ تکرار بر میزان طول شاخه ، تعداد گره (برگ) ، طول طویلترین برگ ، شاخص رشد برگ و میزان قهوه ای شدن بافت (بر اساس نمره دهی از ۱ تا ۳) بررسی شد. تمامی داده ها قبل ازانجام تجزیه واریانس با استفاده از فرمول $\sqrt{x+\frac{1}{2}}$ تبدیل شدند (۶).

نتایج و بحث

۱-۳. اثر تنظیم کننده های رشد

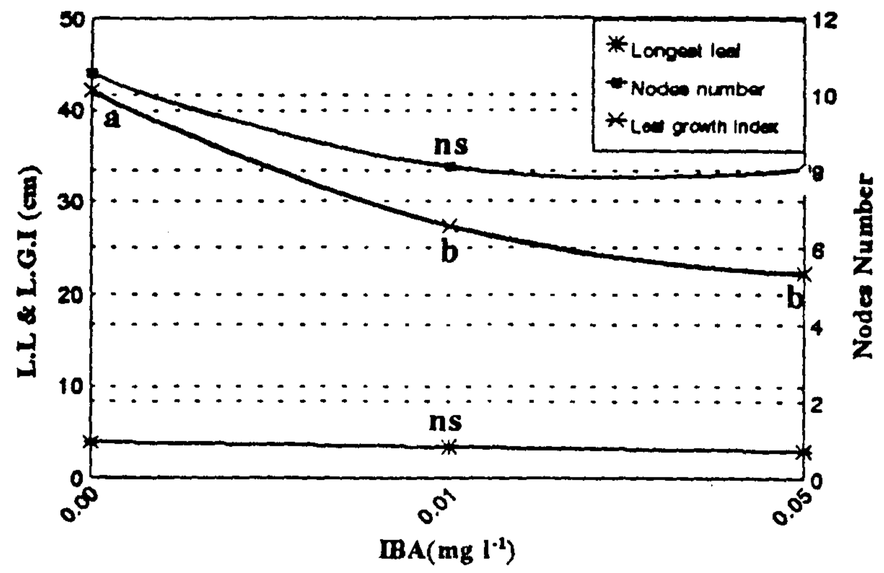
اندازه گیری و تجزیه واریانس شاخصهای رشد شاخه و برگ ریز نمونه ها پس از ۲ ماه حاکی از این است که هورمون IBA فقط بر طول شاخه و شاخص رشد برگ اثر معنی داری در سطح ۵% داشته و بر تعداد گره ، طول طویلترین برگ و قطر پینه انتهایی اثر معنی داری نداشته است . در حالی که هورمون BAP بر روی تمامی شاخصهای مورد مطالعه در سطح ۱ % اثرات معنی داری داشته است .

مقایسه میانگینها برای بررسی اثرات IBA با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵% نشان می دهد که بیشترین طول شاخه و شاخص رشد برگ در تیمار فاقد این هورمون حاصل می شود و تیمارهای IBA ۰/۰۱ mg/l و ۰/۰۵ در سطح بعدی قرار می گیرند (شکل های ۱ و ۲).

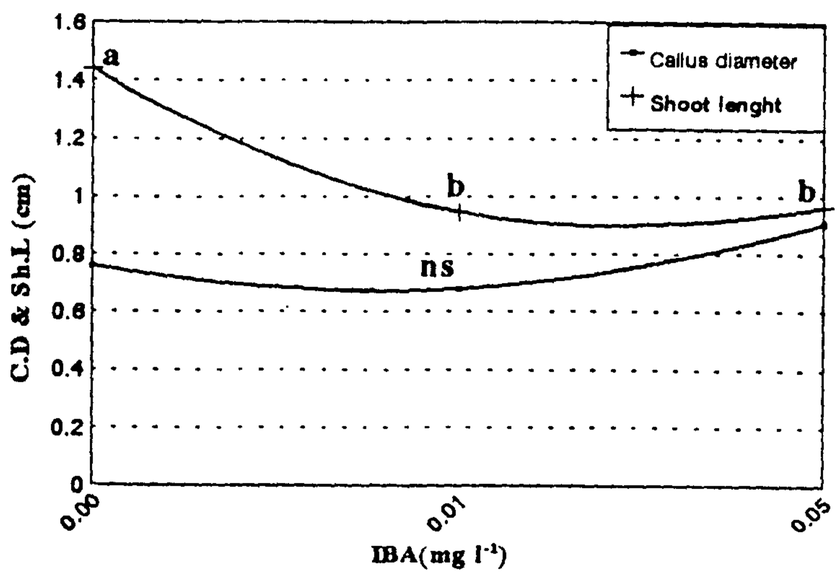
مقایسه میانگینها با آزمون چند دامنه دانکن نشان می دهد که بیشترین مقدار طول شاخه و تعداد گره در غلظتهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP حاصل شده است و اثرات این دو غلظت از نظر آماری در یک‌سطح قراردارند و اثر غلظتهای ۰/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP برروی طول شاخه و تعداد گره در سطح بعدی قرار گرفته اند (شکل های ۳ و ۴).

هورمون BAPدر غلظت یک میلی گرم در لیتر سبب تولید بیشترین مقدار پینه در انتهای ریزنمونه شد و افزایش غلظت آن از ۰/۵ تا ۲ میلی گرم در لیتر سبب کوچکتر شدن برگها گردید. به طوری که کوچکترین اندازه برگها در غلظت ۲میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد. در نهایت ، بیشترین مقدار شاخص رشد برگ که در حقیقت در برگیرنده اکثر شاخصهای فوق است در غلظتهای ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد و غلظتهای کمتر و بیشتر از این حد (۰/۵ mg/l و ۲) سبب کاهش مقدار این شاخص شدند.

اثرات متقابل هورمونهای IBA و BAP فقط در سطح ۵% بر روی شاخص رشد برگ معنی دار بود ، به طوری که

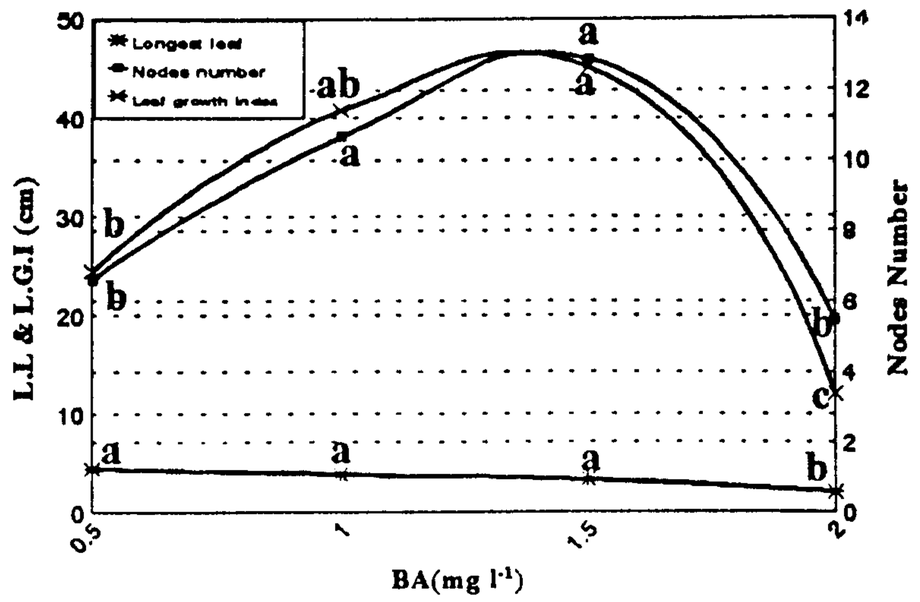


شکل ۱ - اثر غلظت های مختلف هورمون IBA برروی طول طویلترین برگ، تعداد گره و شاخص رشد برگ.

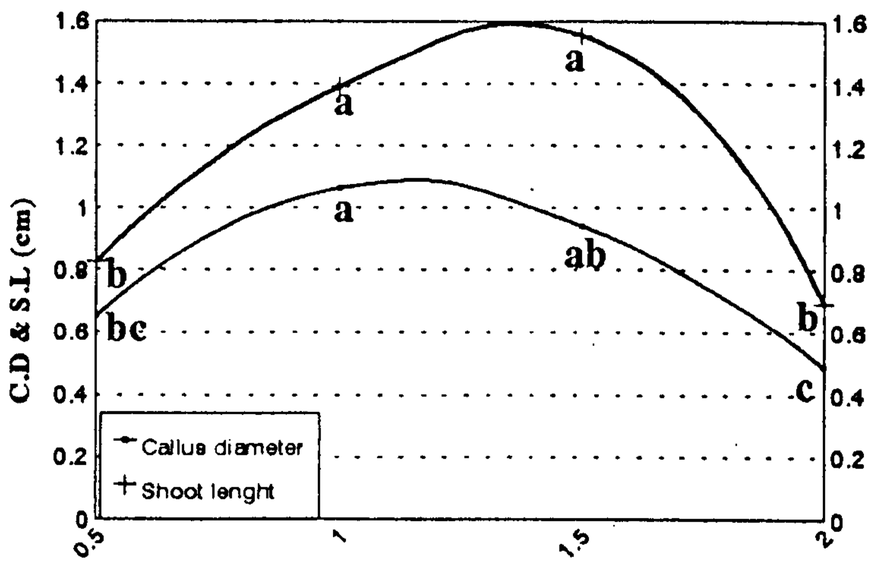


شکل ۲ - اثر غلظت های مختلف هورمون IBA بر روی قطر پینه قاعده ریزنمونه و طول شاخه.

1 - Leaf Growth Index



شکل ۳ - اثر غلظت های مختلف هورمون BA بر روی طول طویلترین برگ، تعداد گره و شاخص رشد برگ.



شکل ۴ - اثر غلظت های مختلف هورمون BA بر روی قطر پینه قاعده ریزنمونه و طول شاخه.

در تمامی غلظتهای IBA افزایش غلظت BAP تا ۱/۵ میلی گرم در لیتر سبب افزایش شاخص برگ می شود ولی غلظتهای بالاتر از آن (۲ mg/l) سبب کاهش این شاخص می گردد (شکل ۵).

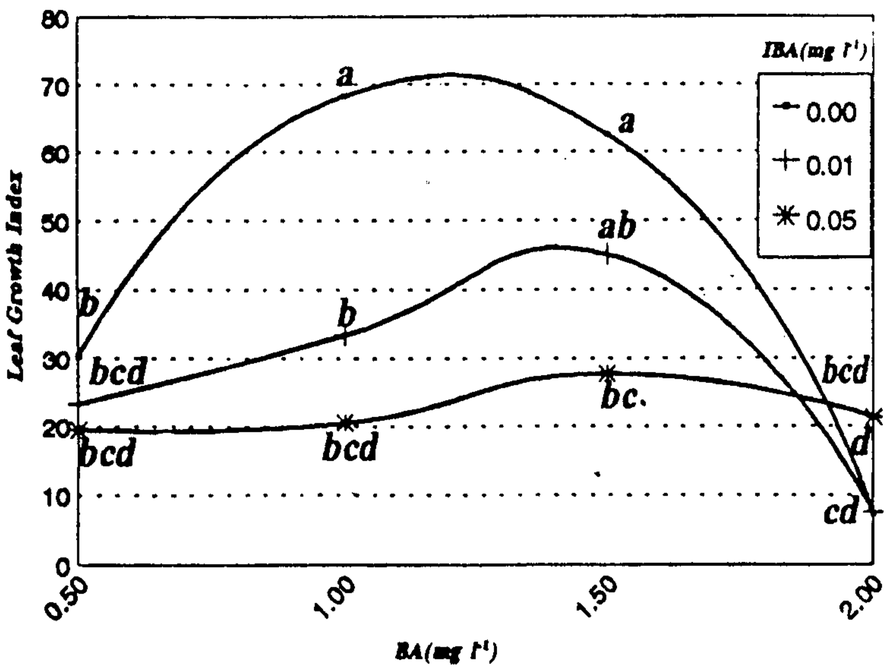
اگر چه چالوپا (۵) با استفاده از هورمونهای NAA (mg/l ۱/۶-۰/۵۴) و BAP (mg/l ۰/۶-۰/۱) در محیط کشت پایه MS موفق به شاخه زایی شد ، ولی درایور و کانیوکی (۷) و مک گراناهان و همکاران (۱۱) و هوزا و همکاران (۹) موفق شدند در محیط کشت پایه DKW دارای BAP (۱mg/l) و IBA (mg/l ۰/۰۱) بهترین رشد شاخه را بدست آورند . تارازو و همکاران(۱۵) نیز تحت همان شرایط ، فقط باتغییر غلظت IBA به mg/l ۰/۱بیشترین طول و تعداد شاخه را بدست آوردند . همان طور که شرح داده شد در این آزمایش نیز بیشترین میزان اکثر شاخصهای رشد شاخه در غلظتهای ۱ mg/l و ۱/۵ BAP بوده است و افزایش غلظت این هورمون نه تنها سبب افزایش رشد شاخه نشده است بلکه منجر به کوچکتر شدن برگها و کم شدن تعداد وطول آنها گردیده است . افزایش غلظت IBA از صفر تا ۰/۰۵ mg/l سبب کاهش کلیه شاخصهای رشد شده است و به بیان بهتر هورمون IBA هیچ نقش مثبتی در شاخه زایی نداشته است ، که از این نظر نتایج ما با نتایج سایر محققین تفاوت دارد . با توجه به شرایطی که برای پژوهش حاضر به کار گرفته شده است ، تصور می شود این اختلاف در نتایج مربوط به اختلاف در تواناییهای ژنتیکی - فیزیولوژیکی گیاهان والد و به احتمال زیاد بیوسنتز مقدار کافی اکسین درون زا باشد (شکل ۶).

۲-۳. اثر مواد آلی نیتروژن دار

اثرات مواد آلی نیتروژن دار بر روی میزان شاخصهای رشد شاخه و قهوه ای شدن بافتها دوماه پس از اولین کشت مورد بررسی قرار گرفت. تمامی ریز نمونه ها در تیمارهای دارای CH + YE و YE در اثر قهوه ای شدن بافت از بین رفته بودند. لذا بررسی میزان شاخصهای رشد ، فقط در تیمارهای شاهد (DKW), CH و BP صورت پذیرفت. در ضمن از آنجاکه در این تیمارها نیز تعدادی از تکرارها در اثر آلودگی از بین رفته بودند ، تعداد تکرار این تیمارها از ۱۱ به ۵ تقلیل داده شد. البته در مورد میزان قهوه ای شدن بافت، این صفت به طور جداگانه و با همان ۱۱ تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که از نظر تمامی صفات (طول شاخه ، تعداد گره ، طول طویلترین برگ ، شاخص رشد برگ و میزان قهوه ای شدن بافت) در سطح ۱% اختلاف معنی داری بین تیمارها وجود دارد.

مقایسه میانگینها با آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که



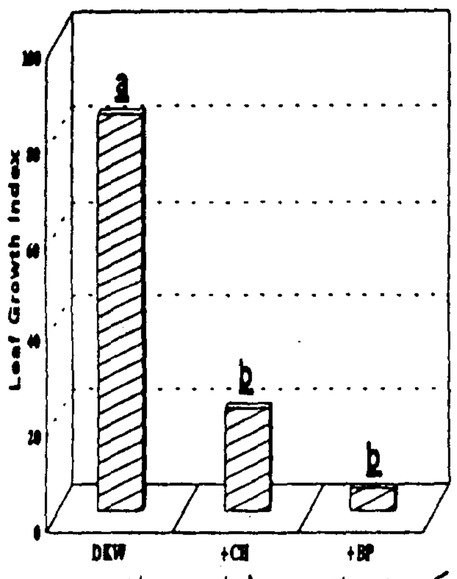
شکل ۵ - اثر متقابل غلظتهای مختلف دو هورمون IBA و BA بر روی شاخص رشد برگ.

شکل ٦ - مراحل شاخه زایی گردوی ایران در محیط کشت DKW دارای BA1 mg/l و فاقد IBA

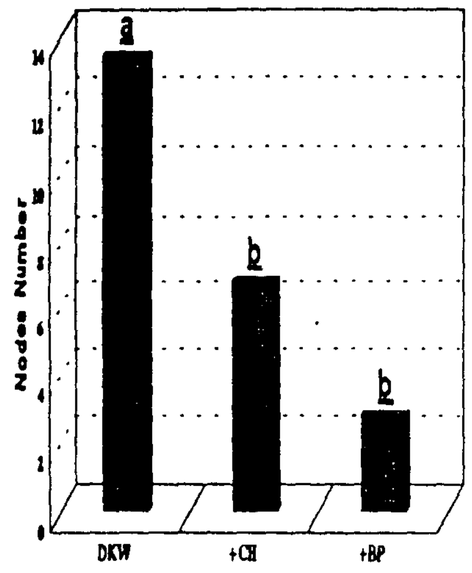
بالاترین میزان برای تمامی شاخصهای رشد شاخه و برگ در تیمار شاهد (محیط کشت DKW) حاصل شده است به طوری که در تمامی سطوح خطا به عنوان تیمار برتر شناخته شد. پس از آن از نظر طول شاخه در سطح خطای ۵% تیمارهای DKW +CH و DKW +BP به ترتیب در سطوح دوم و سوم قرار دارند . تیمارهای DKW +CH و DKW +BP از نظر صفت تعداد گره در سطح ۱% و از نظر صفات طول طویلترین برگ و شاخص رشد برگ تفاوت معنی داری نداشتند (شکل های ۷ تا ۱۰).

مقایسه میانگینها از نظر قهوه ای شدن بافت ریز نمونه ها تحت تاثیر تیمارهای مختلف نشان داد که در سطح ۱% محیطهای دارای CH+YE ، BP و YE موجب تشدید قهوه ای شدن بافت ریزنمونه ها نسبت به سایر تیمارها می شوند. محیط دارای CH+YE قهوه‌ای شدن بیشتری را نسبت به محیط دارای CH و شاهد ایجاد کرد. محیطهای دارای CH و شاهد (DKW) از این نظر در سطوح ماقبل آخر و آخر قرار گرفتند ، و به بیان بهتر محیط شاهد (DKW) کمترین قهوه‌ای شدن را در بافت ریز نمونه ها ایجاد کرد (شکل ۱۱).

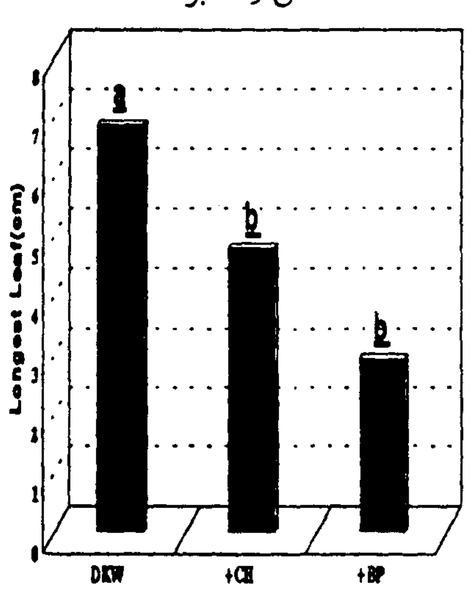
در نهایت مشخص شد که افزودن هیدرولیزات کازئین ، عصاره مخمر ، مخلوط هیدرولیزات کازئین + عصاره مخمر و یا پودر موز به ترتیب با غلظتهای ۰/۵ ، ۱، ۰/۵+۱ و ۳۰ گرم در لیتر نه تنها سبب افزایش شاخصهای رشد شاخه نمی شوند ، بلکه



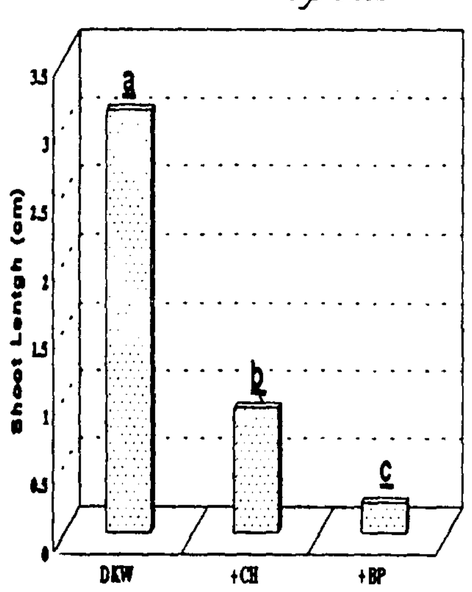
شکل ۸ - اثر محیطهای مختلف بر روی



شکل ۷ - اثر محیطهای مختلف بر روی



شکل ۱۰ - اثر محیطهای مختلف بر روی طول طویلترین برگ

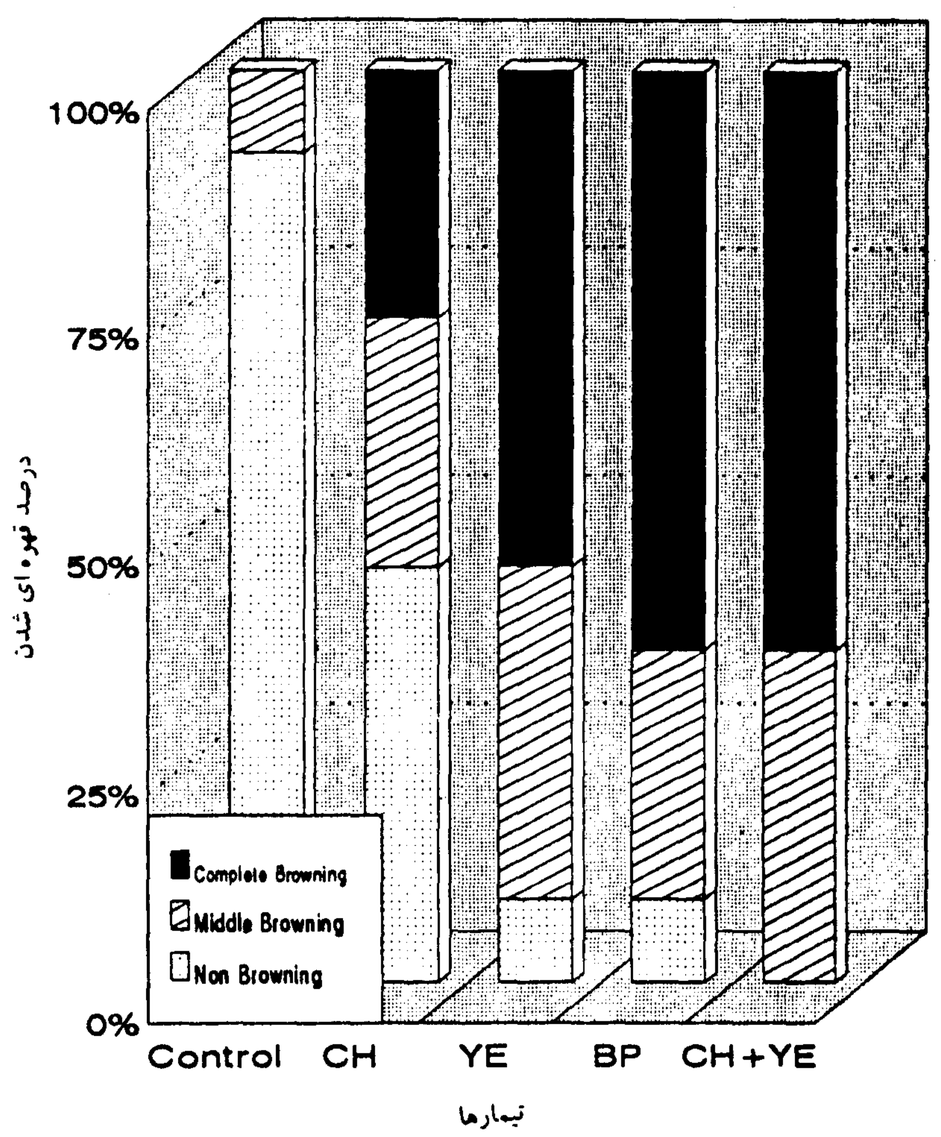


شکل ۹ - اثر محیطهای مختلف بر روی طول شاخه

ظاهرا" به دلیل بالا بودن بیش از حد غلظت مواد درمحیط کشت به صورت یک ماده بازدارنده عمل نموده و سبب کاهش رشد و افزایش قهوه ای شدن بافتها می شوند . مشاهدات عینی روند رشد شاخه ها در

محیطهای مختلف در طول ۲ ماه نشان می دهد که محیطهای دارای مواد آلی نیتروژن دار ، ابتدا سبب رشد سریعتر و ناگهانی برگهای اولیه جداکشتها شده ولی پس از مدتی در اثر قهوه ای شدن بافت ریزنمونه ، ارتباط غذایی آن با محیط کشت قطع می شود و به مرور از بین می رود؛ اما با توجه به این که در اکثر مقایسه میانگینها کازئین هیدرولیزات در مقام دوم بعد از شاهد (محیط کشت پایه DKW) قراردارد به نظر می رسد که امکان تاثیر غلظتهای پایین تر این ماده بر روی افزایش میزان رشد شاخه وجود داشته باشد.

به طور کلی چون فرمول عناصر غذایی محیط کشت DKW که برای کشت بافت گردو عرضه شده است (۷ و ۱۰) ، دارای غلظت عناصر بیشتری نسبت به سایر فرمولهای غذایی می باشد ، با توجه به نتایج این آزمایش مشاهده می شود که افزودن مواد آلی نیتروژن دار که به عنوان مکمل در برخی از فرمولهای غذایی کشت بافت کاربرد دارند ، به فرمول غذایی DKW اثرات نامطلوبی را بر ریز نمونه های گردو به جای می گذارند و بنابراین به نظر می رسد که عناصر غذایی درفرمول DKW ،به‌خصوص‌ازنظر نیتروژن، می‌توانند بخوبی احتیاجات غذایی ریزنمونه های گردو را برآورده نمایند.



شکل ۱۱ - اثر محیطهای مختلف بر روی درصد قهوه ای شدن بافت جدا کشتها

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ - خوشخوی ، م .۱۳۷۳ . فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی . ترجمه. انتشارات دانشگاه شیراز.

۲ - نادری ، ر. ۱۳۷۰. تکثیر غیر جنسی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در رابطه با مواد بازدارنده داخلی . پایان نامه کارشناسی ارشد رشته باغبانی . دانشکده کشاورزی . دانشگاه تهران .

۳ - نصیری ، م . ۱۳۷۲. بررسی روشهای تکثیر گردوی ایرانی . پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم گیاهی . دانشکده علوم . دانشگاه تربیت مدرس .

۴ - وحدتی ،ک. ۱۳۷۵. بررسی روشهای گوناگون کشت درون شیشه ای گردوی ایرانی . گزارش نهایی طرح . پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران .

5 - Chalupa, V. 1981. Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*. Comm. Inst. Forest Coch. Lett. 9:179-187.

6 - Compton, M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture. 37:217-242.

7 - Driver, J. A. & Kuniyuki A. H. 1984. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. Hort Science. 19:507-509.

8 - Gruselle, R., Badia N. Boxus Ph. 1987. Walnut micropropagation , first results. Acta Horticulturae.

212:511-515.

9 - Hoza, D., Standardi, A., Stanica, F. L. & Tudro, T. A. 1992. Preliminary data on *in-vitro* walnut culture *(Juglans regia* L.). Lucrari stiintifice , USAB, seria B. 35:51-55.

10- Mc Granahan, G. H. Driver J. A. Tulecke W. 1987. Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga JM and Durzan D. J. (eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 3. Martinus Nijhoff, Boston, 261-271.

11- Mc Granahan, G. H. Leslie, C. A. & Driver J. A. 1988. *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars. HortScience. 23:220.

12- Rathore, D. S. 1991. Walnuts. In: Mitra S. K., Rathore D. S. & Bose T. K. (eds) Temperate Fruits .Horticulture and Allied Publishers, India. 377-414.

13- Revilla, M. A., Majada, J. & Rodriguez, R. 1989. Walnut *(Juglans regia* L.) micropropagation Ann. Sci. For., 46 supp., 1495-1515.

14- Rodriguez, R., Revilla, A., Albuerne M. & Perez C. 1989. Walnut *(Jugluns spp)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry. In : Bajaj Y. P. S. (ed.) Trees 2, Vol.5, Springer, Berlin Heidelberg, New York. 95-126.

15- Tarrazo, A.R., Sebastian J. I. & Revilla, M. A. 1993. Influence of the phenological state of field growth walnut buds on their *in vitro* establishment. Acta Horticulturae. 311:153-159.

Effects of Some Growth Regulators and Complementary Nitrogen Compounds on *in vitro* Shoot Proliferation of Persian Walnut

K. VAHDATI, A. KHALIGHI, R. NADERI AND A. MAJD

Postgraduate student, Associate professor and , Instructor Department of Horticulture, College of Agriculture, Tehran University and Associate professor, College of Science, Tarbiat Moallem University .

Accepted 30 Sep. 1998

SUMMARY

Two experiments were conducted to investigate the effects of different concentrations of BAP (0.5, 1, 1.5 and 2 mg/l) and IBA (0, 0.01 and 0.05 mg/l) and complementary nitrogen compounds on *in vitro* proliferation rate of *Juglans regial* L. The results showed that BAP at 1-1.5 mg/l increased growth indicies when applied with no IBA in the medium. In the second trial, adding complementary nitrogen compounds (cazein hydrolysate, yeast extract and bannana powder) to the basal medium (DKW) not only did not increase growth indicies but also caused browning of tissues .

Keywords: *Juglans regia* L., proliferation, IBA, BAP, cazein hydrolysate, yeast extract & banana powder