مجله به زراعی کشاورزی، دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز ۱۳۸۹، ص ۸۲-۷۳

# عوامل مؤثر بر بهبود جوانه‌زنی رویان‌های بدنی گردوی ایرانی و تبدیل آن‌ها به گیاهک

**کورش وحدتی [۱*]، حسن بهرامی سرمندی [۲] و سیامک کلانتری [۳]**

تاریخ دریافت: ۸۸/٦/۱ و تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/٤

E-mail: kvahdati@ut.ac.ir

## چکیده

رویان‌های خوب نمو یافته یک لاین رویان‌زای حاصل از لپه‌های نابالغ گردو (*Juglans regia* L.) که بر روی محیط کشت بلوغ (دارای ۰/۳ درصد ژلرایت و دو میلی‌گرم بر لیتر آبسزیک اسید) رشد کرده بودند، انتخاب شدند. رویان‌های بدنی در معرض پیش تیمارهای سرما (به مدت یک ماه در تاریکی در دمای ٤-۳ $^{\circ}C$)، روشهای مختلف خشک کردن (خشک کردن سریع، آهسته و کامل) و ترکیبی از این دو تیمار قرار گرفتند. این آزمایش براساس طرح کاملاً تصادفی و در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران در سال ۱۳۸٦ انجام گرفت. بعد از گذشت سه هفته، رویان‌های بدنی جوانه زده از پیش تیمار سرما توأم با خشک کردن انتخاب و برای رشد و نمو بیشتر، به شش محیط کشت DKW دارای مقادیر مختلف سوکروز، زغال فعال و غلظت‌های مختلف عناصر ماکرو انتقال داده شدند. میزان رشد گیاهک‌ها بعد از چهار هفته ارزیابی شد. فقط ۲٦ درصد رویان‌های بدنی نمو یافته فاقد پیش تیمار دارای ریشه و ساقه بودند، ولی ٥٤ درصد رویان‌هایی که پیش‌تیمار سرما دریافت کرده بودند، به گیاهک تبدیل شدند. در تیمار خشک کردن به صورت سریع، آهسته و کامل به ترتیب ۲۷، ۳۷ و ۵۷ درصد رویان‌های بدنی جوانه زده دارای ریشه و هم ساقه بودند. تیمار نگهداری در سرما در ترکیب با خشک کردن کامل سبب بالا بردن درصد جوانه‌زنی رویان‌های بدنی تا ۷۳ درصد شد. افزودن زغال فعال و غلظت سوکروز همچنین کاهش غلظت عناصر پرمصرف و کم مصرف اثر معنی‌داری روی رشد طولی ساقه نداشتند، ولی اثر چشم‌گیری روی رشد ریشه داشتند. بالاترین طول ریشه در محیط کشت پایه ½ DKW با ۰/۵ درصد سوکروز و یک درصد زغال فعال مشاهده شد.

**کلمات کلیدی:** پیش‌تیمار، تبدیل به گیاهک، جنین زایی، سوماتیکی جوانه‌زنی، گردو

---

۱- دانشیار، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران – ایران (**[*]مسئول مکاتبه**)

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران – ایران

۳- استادیار، گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج - ایران

## مقدمه

یکی از مشکلات تولید گیاهان تراریخت، فقدان یک سیستم قابل اطمینان برای باززایی سلول‌های تراریخت است. رویان‌زایی بدنی یک سیستم مفید برای انتقال ژن و باززایی گیاهان تراریخت است. اگرچه رویان‌زایی بدنی موفق در گیاهان متعددی صورت گرفته است، ولی گزارش باززایی گیاهان از رویان‌های بدنی اندک است که این موضوع به خاطر راندمان پایین جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک شدن رویان‌های بدنی است (۱۸). راندمان پایین جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک یک مانع مهم و موثر بر سر راه رویان‌زایی بدنی در مورد بسیاری از گیاهان است (۱٤).

یکی از روشهای رفع مشکل جوانه‌زنی رویان‌های بدنی، الگوگیری از رویان‌های جنسی است. رویان جنسی بذر قادر است به مدت طولانی انبار شود زیرا درحالی‌که هنوز بر روی گیاه قرار دارد، دستخوش خشک کردن می‌شوند و از لحاظ متابولیسمی ساکن[1] می‌شوند (۳ و ۱۲). ثابت شده است که در صورت خشک کردن رویان‌های بدنی، آنها را نیز می‌توان به میزان مساوی رویان‌های جنسی برای مدت طولانی در حالت خشک شده در دمای اتاق نگهداری کرد (۲ و ٦). به همین دلیل، در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی خشک کردن یک ویژگی برجسته مراحل نمو رویان‌های جنسی است، که در انتقال بلوغ به جوانه‌زنی رویان نقش دارد (۱۰).

تیمار رویان‌های بالغ شده با جیبرلیک اسید (GA3)، آبسزیک اسید (ABA)، سرما و خشک کردن می‌تواند جوانه-زنی را القاء کند (۲۰ و ۲۱). در گردو، بعد از تیمار سرمای رویان‌های بدنی به مدت دو ماه در دمای ٤°C-۲ گیاهان کامل باززایی شدند (۱۹). با این وجود، دیگر محققین راندمان بسیار پایینی برای رویان‌های بدنی *Juglans regia* و *Juglans nigra* × *Juglans regia* به دست آوردند (۵ و ۱۱). از تیمار خشک کردن برای افزایش جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک در گیاهان *Vitis longii*، *Dactylis glomerata*، *Glycine max*، *Carya illinoensis* و هیبرید *Picea glauca* × *Picea engelmannii* نیز استفاده شده است (٦، ۸، ۱٦، ۱۷ و ۲۲).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر نوع پیش تیمار خشک کردن درمقایسه با پیش‌تیمار سرما و همچنین تأثیر ترکیب این دو نوع پیش‌تیمار بر روی جوانه‌زنی رویان‌های بدنی بود. تأثیر غلظت‌های نمک‌های محیط کشت، سوکروز و زغال فعال بر روی رشد و نمو گیاهک‌ها نیز در این مطالعه بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### لاین رویان بدنی

در این مطالعه، از یک لاین رویان بدنی حاصل از لپه‌های نابالغ جنین جنسی ژنوتیپ $G_{79}$ گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) استفاده شد (۲۱). این لاین هر دو هفته یک بار بر روی محیط کشت DKW واکشت و در تاریکی در دمای ۲۵ °C برای چندین سال نگهداری می‌شد.

### بلوغ رویان‌های بدنی

رویان‌های بدنی در مرحله کروی شکل[2] انتخاب و سپس به مدت یک ماه با هفته‌ای یک بار واکشت بر روی محیط مشابه در تاریکی و دمای ۲۵ °C بر روی محیط کشت بلوغ قرار داده می‌شدند. رویان‌های بدنی خوب نمو یافته از محیط کشت بلوغ برای جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک انتخاب می‌شدند.

### محیط کشت بلوغ

محیط کشت بلوغ شامل عناصر غذایی کم‌مصرف و پرمصرف محیط کشت DKW بود که به آن دو میلی‌گرم بر لیتر ABA (به‌وسیله فیلتر استریل شده) و ۳۰ گرم سوکروز اضافه شده بود. pH محیط با استفاده از سود یک مولار بین ۵/۷-۵/۵ تنظیم شد و به موارد فوق ۰/۳ درصد ژلرایت افزوده شد و محیط‌های کشت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر در اتوکلاو سترون

1 - Quiescent

2 -Globular

شدند.

**پیش تیمارها برای افزایش جوانه‌زنی**

**پیش‌تیمار سرما**

رویان‌های بدنی بالغ شده بر روی محیط کشت بلوغ به محیط کشت پایه DKW انتقال داده شدند و سپس در تاریکی در دمای ۴-۳°C قبل ازانتقال به محیط کشت جوانه‌زنی، به مدت یک ماه نگهداری شدند.

**تیمارهای خشک کردن**

رویان‌های بالغ شده در محیط کشت دارای ۰/۳ درصد ژلرایت در معرض سه روش خشک‌سازی قرار گرفتند:

**الف) خشک کردن سریع**[1] : رویان‌های بدنی در پتری‌دیش‌های باز قرار داده شدند و در زیر هود لامینار به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه نگاه داشته شدند.

**ب) خشک کردن آهسته**[2] : رویان‌های بدنی در پتری‌دیش قرار گرفتند و درب پتری‌ها بسته شد ولی با پارافیلم محکم نشد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در زیر هود لامینار قرار گرفتند.

**ج) خشک کردن کامل**[3] : رویان‌های بدنی در پتری‌دیش‌های خالی استریل قرار داده شدند و بدون محکم کردن درب پتری‌ها با پارافیلم در دیسکاتورهایی که دارای نمک اشباع شده $ZnSO_4 . 7H_2O$ بودند در تاریکی و در دمای ۲۵°C به مدت سه روز قرار داده شدند.

**پیش‌تیمار سرما توأم با تیمار خشک کردن**

به دنبال یک ماه نگهداری در سرمای ۴-۳°C، رویان‌های بدنی با خشک کردن کامل تیمار شدند.

**محیط کشت جوانه‌زنی**

بعد از پیش تیمارها، رویان‌های بدنی بر روی محیط کشت DKW تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP)، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین (Kin)، دو میلی‌گرم بر لیتر اسید جیبرلیک ($GA_3$)، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز قرار داده شدند. pH محیط با استفاده از سود یک مولار بین ۵/۷-۵/۵ تنظیم شد. به موارد فوق ۲/۲ گرم بر لیتر ژلرایت افزوده شد و محیط‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر در اتوکلاو سترون گردیدند. محلول اسید جیبرلیک استریل شده به وسیله فیلتر به محیط کشت اتوکلاو شده با دمای ۷۰-۶۰ درجه اضافه شد.

رویان‌های بدنی بدون پیش‌تیمار که به طور مستقیم بر روی محیط کشت جوانه‌زنی قرار داده شدند، به عنوان شاهد درنظر گرفته شدند.

رویان‌های بدنی در محیط کشت جوانه‌زنی در اتاقک رشد در دمای ۲۵°C با رژیم نوری ۱۶/۸ ساعت تاریکی - روشنایی قرار داده شدند.

**رشد و نمو گیاهک‌ها**

بعد از گذشت سه هفته، رویان‌های بدنی جوانه زده در محیط کشت جوانه‌زنی، برای رشد و نمو بیشتر، از پیش‌تیمار جوانه‌زنی سرما توأم با خشک کردن انتخاب و به شش محیط کشت زیر که با ۲/۲ گرم بر لیتر ژلرایت جامد شده و دارای pH ۵/۷-۵/۵ بودند انتقال داده شدند. محیط کشت رشد و نمو به مقدار ۳۰ میلی لیتر در هر شیشه مربا ریخته شد.

A - محیط کشت پایه DKW + ۰/۳ درصد سوکروز

B - محیط کشت پایه DKW + ۰/۳ درصد سوکروز + یک درصد زغال فعال

C - محیط کشت پایه DKW + ۰/۵ درصد سوکروز

D - محیط کشت پایه DKW + ۰/۵درصد سوکروز+ یک درصد زغال فعال

E - ½ DKW + ۰/۵ درصد سوکروز

F - ½ DKW + ۰/۵ **درصد سوکروز + یک درصد زغال فعال**

**مکان آزمایش و روش تجزیه آماری**

این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۶ دو بار تکرار شد. در هر تیمار چهار پتری‌دیش (هر پتری‌دیش به عنوان یک تکرار) و در هر پتری‌دیش ۱۰ رویان بدنی قرار داده شد. رشد گیاهک‌ها بعد از چهار هفته به وسیله اندازه‌گیری ارتفاع ساقه، طول ریشه و تعداد برگ ارزیابی شد. داده‌ها براساس

1 - Fast desiccation (Rapid drying)
2 - Slow Desiccation (Slow Drying)
3 - Full Desiccation (Full Drying)

طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS9 تجزیه شدند. مقایسه میانگین به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $P\leq ۰/۰۵$ انجام شد.

## نتایج و بحث

در محیط‌های کشت جوانه‌زنی، رویان‌های بدنی ابتدا ریشه و سپس ساقه تولید کردند. جوانه‌زنی رویان‌های بدنی به سه صورت جوانه‌زنی فقط ساقه، جوانه‌زنی فقط ریشه و دارای هر دو ساقه و ریشه، مشاهده شد (جدول ۱). بدون به‌کار بردن پیش تیمار (شاهد)، ۲٦ درصد از رویان‌های بدنی گیاهک‌های دارای ریشه و ساقه تولید کردند. به‌کار بردن یک دوره سرما (دمای چهار درجه سانتی‌گراد) یک ماهه به عنوان پیش تیمار جوانه‌زنی، اثر معنی‌داری بر روی راندمان تبدیل به گیاهک داشت و آن را تا ٥٤ درصد افزایش داد. اگرچه اثر این تیمار به طور خاص برروی افزایش جوانه‌زنی رویان-های دارای فقط ریشه بیشتر بود.

**جدول ۱ - اثرات پیش تیمارها روی جوانه‌زنی رویان‌های بدنی گردوی ایرانی**

| پیش تیمار | تبدیل به گیاهک (ساقه + ریشه) (درصد) | انواع رویان‌های جوانه زده | |
|---|---|---|---|
| | | جوانه‌زنی فقط ساقه (درصد) | جوانه‌زنی فقط ریشه (درصد) |
| شاهد | ۱/۰۰ c | ٤/۰۰ a | ۳/۵۰ a |
| نگهداری در سرما | ۲/۷۵ b | ۳/۰۰ ab | ۲/۷۵ a |
| خشک کردن سریع | ۲/۰۰ c | ۲/۵۰ b | ۲/۰۰b |
| خشک کردن آهسته | ۲/۵۰ c | ۳/۰۰ ab | ۲/۰۰b |
| خشک کردن کامل | ۳/۰۰ b | ۳/۰۰ ab | ۲/۲۵b |
| نگهداری در سرما+ خشک کردن کامل | ٤/۲۵ a | ۲/۵۰ b | ۱/۲۵ c |

**میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.**

رویان‌های بدنی که پیش‌تیمارهای خشک کردن سریع، آهسته و کامل را دریافت کردند نسبت به تیمار شاهد، به‌ترتیب ۱، ۱/۵ و ۲ درصد گیاهک‌های دارای هر دو ریشه و ساقه بیشتر تولید کردند (جدول ۱). اگرچه خشک کردن سریع و آهسته اثر معنی‌داری بر روی جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک نداشت ولی تا حدودی سبب افزایش جوانه‌زنی و تولید رویان‌های دارای فقط ساقه شد. ترکیب دو پیش‌تیمار سرما و خشک کردن کامل سبب شد که رویان‌های بدنی در حدود پنج روز زودتر از پیش‌تیمارهای سرما و خشک کردن کامل به تنهایی، جوانه بزنند و درصد جوانه‌زنی گیاهک‌هایی که دارای هم ریشه و هم ساقه بودند به‌طور معنی‌داری نسبت به پیش‌تیمارهای نگهداری در سرما و خشک کردن کامل به تنهایی، بالاتر بود (جدول ۱). در راندمان تبدیل رویان‌های بدنی به گیاهک اختلاف معنی‌داری بین پیش‌تیمارهای نگهداری در سرما و خشک کردن کامل و همچنین بین خشک کردن سریع و آهسته مشاهده نشد. تیمار شاهد بالاترین درصد جوانه‌زنی رویان‌های دارای فقط ساقه و تیمار نگهداری در سرما پایین‌ترین درصد را نشان داد (جدول ۱). رویان‌های جوانه‌زده در تیمار شاهد خوشه‌هایی از جوانه‌های ساقه، که از مناطق مریستم جانبی محور بالای لپه و گره لپه‌ای منشاء می‌گرفتند را تولید کردند (شکل ۱).

جوانه‌زنی فقط ریشه در دو تیمار شاهد و نگهداری در سرما بالاترین راندمان و در تیمار ترکیبی خشک کردن کامل

و نگهداری در سرما پایین‌ترین راندمان را داشت (جدول ۱). خشک کردن و نگهداری در سرما برای پیشبرد جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک بسیار مفید است، زیرا رویان‌های بدنی که در معرض هیچ نوع پیش‌تیماری قرار نگرفتند راندمان جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک بسیار پایینی را نشان دادند. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار سرمایی توأم با پیش تیمار خشک کردن کامل بهترین اثر را بر روی جوانه‌زنی و راندمان تبدیل به گیاهک داشت.

برای بررسی اثر زغال فعال و غلظت‌های مختلف عناصر غذایی محیط کشت و سوکروز، گیاهک‌های حاصل از پیش‌تیمارهای سرما توأم با خشک کردن کامل، که دارای ریشه و ساقه بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. زغال فعال و کاهش غلظت عناصر پرمصرف و کم‌مصرف محیط کشت DKW و همچنین غلظت سوکروز اثر معنی‌داری بر روی رشد طولی ساقه نداشتند (جدول ۲). با این وجود، در محیط‌های کشت بدون زغال فعال و غلظت‌های بالای سوکروز و عناصر غذایی، در قاعده ساقه رویان‌های بدنی جوانه‌زده کالوس تشکیل می‌شد.

زغال فعال و کاهش پتانسیل اسمزی که به وسیله کاهش غلظت سوکروز و عناصر غذایی محیط کشت ایجاد می‌شد، اثر چشم‌گیری بر روی رشد ریشه داشت و بدین ترتیب بالاترین طول ریشه در محیط کشت رشد و نمو F مشاهده شد (شکل ۲ – A). در محیط‌های کشت با پتانسیل اسمزی بالا همانند محیط کشت A گیاهک‌ها دارای ریشه‌های کوتاهتر و محور زیرلپه ورم کرده بودند (شکل ۲ – B). اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های استفاده شده برای رشد و نمو گیاهک‌ها برای تعداد برگ‌ها بر روی ساقه مشاهده نشد، به‌جز برای محیط کشت DKW ½ + ۰/۵ درصد سوکروز + یک درصد زغال فعال (جدول ۲). در این محیط، برگ‌ها از نظر مورفولوژی بزرگتر ولی دارای دمبرگ کوتاهتری نسبت سایر محیط‌ها بودند. کوچکترین برگ‌ها در محیط کشت A مشاهده شد (شکل ۲ – B).

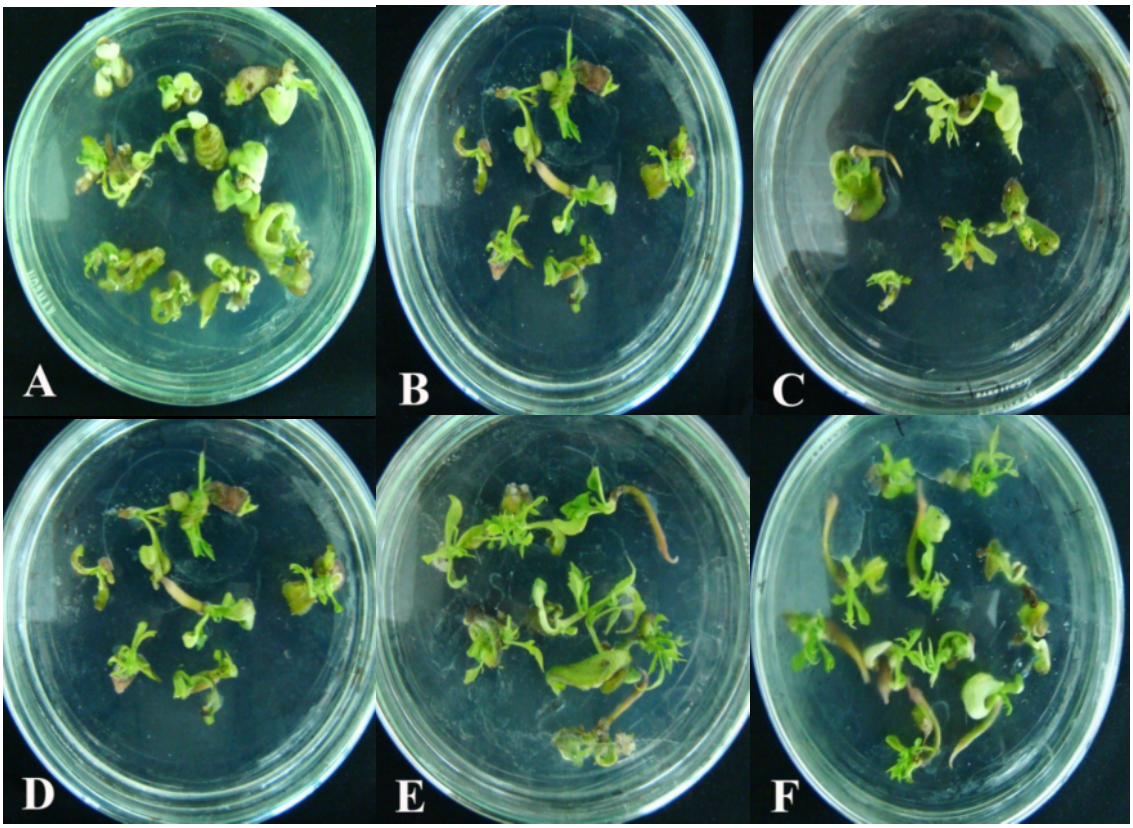
**جدول ۲ – تأثیر عناصر غذایی محیط کشت، غلظت‌های سوکروز و زغال فعال بر رشد و نمو گیاهک‌های حاصل از جوانه‌زنی رویان‌های بدنی گردوی ایرانی**

| محیط کشت | طول ساقه (سانتی‌متر) | طول ریشه (سانتی‌متر) | تعداد برگ |
|---|---|---|---|
| A | ۸/۷۳ a | ۲/۵۰ b | ٦/۰۰ b |
| B | ۷/۳۸ a | ۳/۱۰ b | ۷/۰۰ b |
| C | ۵/۳۳ b | ۲/۷۳ b | ۵/٦٦ b |
| D | ۵/۵۵ b | ۳/۱۳ b | ٦/۰۰ b |
| E | ۵/۸٤ b | ٤/۹۳ a | ۷/۰۰ b |
| F | ۵/۹٦ b | ۵/۲۲ a | ۹/۳۳ a |

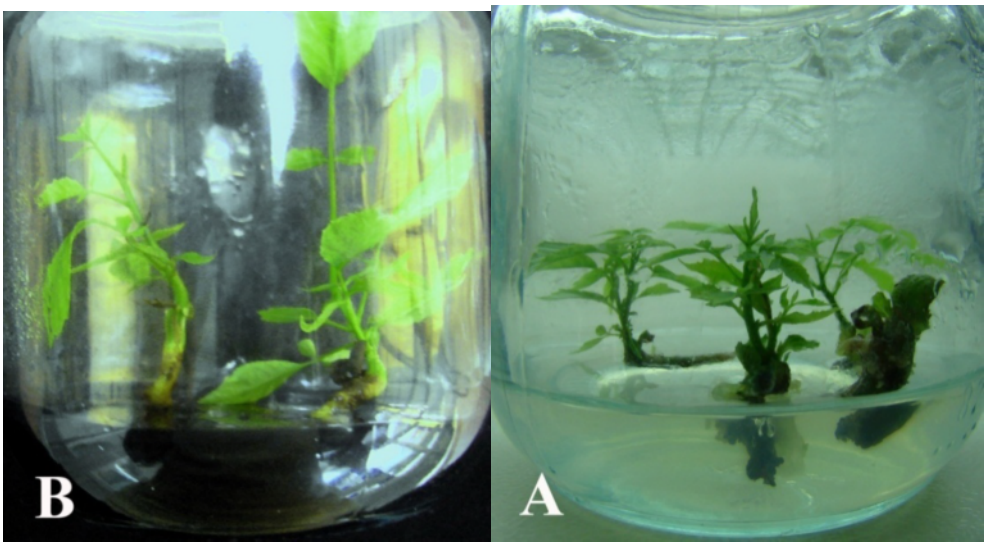
**میانگین‌های دارای حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری با هم دارند.**

مشخصه رویان‌های بدنی، ساختار دوقطبی آن‌ها است که آن‌ها را قادر می‌سازد تا به یک گیاه کامل تبدیل شوند، اما راندمان جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک در این رویان‌ها در بسیاری از موارد پایین است. تلاش‌های زیادی برای بهبود جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک رویان‌های بدنی صورت گرفته است (١٤). یکی از روشها تقلید شرایط جوانه‌زنی رویان‌های

جنسی است. از مشخصه‌های رویان‌زایی جنسی بالغ در درختان میوه مناطق معتدله کاهش رطوبت آنها قبل از بلوغ است (۱۰ و ۲۲). بنابراین از این تیمار می‌توان برای پایان بخشیدن به فرایند تکاملی رویان‌زایی، جوانه‌زنی و نمو گیاهچه از رویان‌های بدنی استفاده کرد. بهترین نتایج در این مطالعه، برای رویان‌های با رشد و نمو ریشه و ساقه، با کاربرد ترکیبی از تیمار نگهداری در سرما و خشک کردن کامل به‌دست آمد (جدول۱).




**شکل ۱ – اثر پیش‌تیمارهای مختلف بر جوانه‌زنی رویان‌های بدنی گردو. (A) تیمار شاهد، (B) پیش‌تیمار سرما، (C) پیش‌تیمار خشک کردن سریع، (D) پیش‌تیمار خشک کردن آهسته، (E) پیش‌تیمار خشک کردن کامل، (F) پیش‌تیمار سرما توأم با خشک کردن کامل**




**شکل ۲ – اثر تیمارهای مختلف بر رشد و نمو گیاهک‌های حاصل از رویان‌های بدنی گردو. (A) رشد و نمو گیاهک‌ها در محیط کشت پایه DKW + ۰/۳ درصد سوکروز (شاهد) (B) رشد و نمو گیاهک‌ها در DKW ½ + ۰/۵ درصد سوکروز + ۱ درصد زغال فعال**

طی تحقیقات سودمندی تیمارهای آب‌گیری[1] برای جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک رویان‌های بدنی در انگور ثابت شد (٦). طبق گزارشات ارائه شده، آب‌گیری در شکستن خواب رویان و احتمالا مکانیسم‌های تنظیمی که رشد بعد از جوانه‌زنی رویان‌های بالغ را کنترل می‌کند، نقش ایفا می‌کند (٦). محققین گزارش دادند که خشک کردن سبب بیان ژن‌های جوانه‌زنی می‌شود (۱۰). تحقیقان نشان داد بالاترین درصد جوانه‌زنی (۹۵ درصد) رویان‌های بدنی صنوبر به‌وسیله رویان‌های تیمار شده با رطوبت ۹۵ درصد ایجاد می‌شوند. رویان‌های بدنی *Sitka spruce* زمانی که با میزان رطوبت نسبی بالا تیمار شدند، تنها فقط ۱۵ درصد از محتوای آبی خود را از دست دادند (۱۷). این نتایج نشان می‌دهد که رویان‌های بدنی هر گیاه در رطوبت نسبی خاص به محتوای آبی ویژه‌ای می‌رسند. راندمان از دست دادن آب و زمان موردنیاز برای رسیدن به محتوای آبی معین تا حدی به اندازه رویان گونه‌های گیاهی بستگی دارد (۷). تفاوت در تحمل خشک کردن در میان گونه‌های مختلف ممکن است بازتاب اختلافشان در درجه بلوغ باشد (۱۷).

خشک کردن برای افزایش جوانه‌زنی و تبدیل به گیاهک رویان بدنی در تعداد دیگری از گونه‌های گیاهی از قبیل *Vitis longii* و *Dactylis glomerata* (٦ و ۷)، *Picea glauca* × *Picea engelmannii* (۱۷)، *Picea glauca* (۲)، *Glycine max* (۸)، *Medicago sativa* (۱) و *Triticum aestivum* (٤)، نیز موفقیت آمیز بوده است. در دیگر تحقیقات نیز گزارش شد که در *Juglans nigra* × *Juglans regia* رویان‌های بدنی خشک شده در حدود ٤٥ درصد جوانه زدند و در مقابل رویان‌های تیمار شده با سرما یا اسید جیبرلیک ۱۰ درصد جوانه‌زنی داشتند (۵).

در آزمایش حاضر تیمار نگهداری در سرما سبب افزایش راندمان تبدیل به گیاهک درمقایسه با تیمار شاهد شد (جدول ۱). بنابراین، می‌توان گفت همان‌طور که بذرهای گردو برای جوانه‌زنی نیاز به چینه سرمایی دارند، رویان‌های بدنی نیز نیاز به بکار بردن دوره سرمایی برای شکستن خواب جوانه انتهایی دارند. تحقیقات نشان دادند که در گردو، بعد از یک دوره تیمار نگهداری در سرما گیاه کامل از رویان‌های بدنی *Juglans regia* باززایی شد (۱۹). نتایج مشابه نیز در *Juglans nigra* × *Juglans regia* و *Juglans regia* گزارش شده است (۵ و ۱۱).

مفید بودن اضافه کردن زغال فعال در محیط کشت نیز

1 - Dehydration

در کشت‌های زیادی از قبیل *Carica stipulate* و *Anemone canadensis* گزارش شده است (۳ و ۹). تحقیقات نشان دادند که زغال فعال تعدادی از ترکیبات از قبیل اکسین‌ها و متابولیت‌های محیط کشت را که اغلب مراحل نموی رویان‌های بدنی را مهار می‌کنند، جذب می‌کند (۱۵).

به طور کلی، نتایج ما نشان داد که پیش‌تیمارهای جوانه‌زنی، نگهداری در سرما و سپس خشک کردن به‌طور معنی‌داری راندمان تبدیل به گیاهک را در رویان‌های بدنی گردوی ایرانی افزایش می‌دهد و استفاده از این پیش‌تیمارها برای به‌دست آوردن راندمان بالای تبدیل به گیاهک ضروری است. همچنین اضافه کردن زغال فعال و کاهش دادن غلظت عناصر غذایی و سوکروز در محیط کشت سبب افزایش رشد و نمو گیاهک‌های حاصل از رویان‌های بدنی می‌شود. البته توانایی به‌دست آوردن رویان‌های جوانه‌زده لزوماً نشان‌دهنده رشد پیوسته و توانمند نیست، زیرا گیاهک‌های خارج شده از شرایط جوانه‌زنی اغلب در ادامه رشد و نمو ضعیف هستند و این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر در تیمارهای بعد از جوانه‌زنی دارد.

## تشکر و قدردانی

از پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و صندوق حمایت از پژوهش‌گران و فن‌آوران به جهت حمایت‌های مالی از این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

**References**

1. Anandarajah K and McKersie BD (1990) Manipulating the desiccation tolerance and vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with sucrose, heat shock and abscisic acid. Plant Cell Rep. 9: 451–455
2. Attree SM, Pomeroy MK and Fowke LC (1995) Development of white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. J. Exp. Bot. 46(285): 433–439.
3. Bewley JD (1995) Physiological aspects of desiccation tolerance – a retrospect. Int. J. Plant Sci. 156(4): 393-403
4. Carman JG (1988) Improved somatic embryogenesis in wheat by partial stimulation of the in-ovulo oxygen, growth-regulator and desiccation environments. Planta. 175: 417-424.
5. Deng MD and Cornu D (1992) Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant Cell Tiss. Org. 28: 195-202.
6. Gray DJ (1987) Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. HortSci. 22: 810-814.
7. Gray DJ (1989) Effects of dehydration and exogenous growth regulators on dormancy, quiescence and germination of grape somatic embryos. In Vitro Cell Dev. Biol. 25: 1173-1178.
8. Hammatt N and Davey MR (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L.). J. Plant Physiol. 128: 219-226.
9. Johansson LB, Calleberg E and Gedin A (1990) Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of Anemone canadensis. Physiol. Plant 80: 243–249.
10. Kermode AR and Bewley DJ (1985) The role of maturation drying in the transition from seed development to germination, J. Expe. Bot. 1916-1927.

11. Lee BC, Shim SY and Lee SK (1988) Mass propagation of somatic embryos in *Juglans regia* L. (English walnut). Res. Rep. Inst. For. Genet. Korea. 24: 99-106.

12. Leopold AC and Vertucci CW (1989) Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. *In*: Stanwood PC and McDonald MB (Eds.), Seed moisture. Madison, WI: Crop Science Society of America. Pp. 51-67.

13. Litz R and Conover R (1980) Somatic embryogenesis in cell culture of *Carica stipulata*. HortSci. 15: 733-735.

14. Merkle SA, Parrott WA and Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. *In*: Thorpe TA (Eds.), In vitro embryogenesis in plants (Current plant science and biotechnology in agriculture, Vol. 20). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. Pp. 155-203.

15. Pan MJ and Van Staden J (1998) The use of charcoal in in vitro culture-a review. Plant Growth Regul. 26: 155-163.

16. Parrott WA, Dryden G, Vogt S, Hildebrand DF, Collins GB and Williams EG (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. In Vitro Cell Dev. Biol. 24: 817-820.

17. Roberts DR, Sutton BCS and Flinn BS (1990) synchronous Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. Can. J. Bot. 68: 1086-1090.

18. Thorpe TA (1995) In vitro embryogenesis in plants (Current plant science and biotechnology in agriculture, Vol. 20). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

19. Tulecke W and McGranahan GH (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. Plant Sci. 40: 57-63.

20. Vahdati K, Bayat Sh, Ebrahimzadeh H, Jariteh M and Mirmasoumi M (2008) Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia L.*). Plant Cell Tiss. Org. 93: 163-171.

21. Vahdati K, Jariteh M, Niknamm V, Mirmasoumi M and Ebrahimzadeh H (2006) Somatic embryogenesis and embryo maturation in Persian walnut. Acta Hortic. 705: 199-205.

22. Wetzstein HY, Ault JR and Merkle SA (1989) Further characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in pecan (*Carys illinoensis*). Plant Sci. 64: 193-201.

# Factors affecting germination of somatic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.) and their conversion to plantlets

**K. Vahdati [1], H. Bahrami Sermandi [2] and S. Kalantari [3]**
E-mial: kvahdati@ut.ac.ir

## Abstract

Somatic embryos which were derived from immature cotyledons of a Persian walnut genotype had been grown on DKW medium supplemented with gelrite 0.3% and ABA (2 mg $l^{-1}$). For maturation, somatic embryos were treated with chilling pre-treatment (one month in dark at (3-4$^{C}$), different desiccation methods (fast, slow and full) and combination of chilling and desiccation treatments. The experiment was conducted as RCD in tissue culture laboratory of College of Abouraihan, University of Tehran, Iran in 2007. After three weeks, plantlets obtained from this treatment were transferred to six plantlets developing media (including full and half strength DKW with different levels of sucrose and activated charcoal). Without any pretreatment, 26% of somatic embryos germinated, while those treated with cold-pretreatment germinated at 54% with both shoots and roots. Somatic embryos treated with fast, slow and full desiccation, germinated at 27, 37 and 57% with both shoots and roots, respectively. Cold storage for two months in combination with full desiccation resulted in higher amounts of somatic embryos germination (73%) which had both shoots and roots. Adding activated charcoal and sucrose, also reducing amounts of macro and micro nutrients did not have significant effect on shoot length. Adding activated charcoal enhanced root development.

**Key words:** Cold, Desiccation, Drying, Pre-treatment, Somatic embryogenesis

1- Associate Professor, Department of Horticulture, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran – Iran **(Corresponding Author)**
2- M.Sc. Former Student, Department of Horticulture, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran – Iran
3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj – Iran