Mikropropagacija oraha (Juglans regia L.) in vitro

Pejić, Silvija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:159485

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Silvija Pejić
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda
Smjer Hortikultura

Mikropropagacija oraha (*Juglans regia* L.) *in vitro*

Završni rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Silvija Pejić
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda
Smjer Hortikultura

Mikropropagacija oraha (*Juglans regia* L.) *in vitro*

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:
1. mag.ing.agr. Dejan Bošnjak, mentor
2. prof.dr.sc. Aleksandar Stanisavljević, član
3. dr.sc. Monika Tkalec Kojić, član

Osijek, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij, smjer Hortikultura

Završni rad

Mikropropagacija oraha (*Juglans regia* L.) *in vitro*

Silvija Pejić

Sažetak: Najčešći problem u mikropropagaciji oraha predstavlja posmeđenje hranjivog medija. Značajan je utjecaj i genotipa. Najprikladniji medij za orah je DKW medij s koncentracijom saharoze od 3 %. BAP, IBA i GA_3 imaju pozitivan utjecaj na klijanje embrija, razvoj kalusa i proliferaciju pupova. Kao zgušnjivač najčešće se upotrebljava agar. Okolišni uvjeti svjetlosti od 1000 do 3000 lux-a (cca. 40 – 92 μmol/m^{-2}/s^{-1}) i temperatura u rasponu od 22 do 28 °C najčešće se koriste u kulturi tkiva oraha. Rizogeneza mikroizdanaka može se postići u *in vitro* i *ex vitro* uvjetima. Predtretman s IBA-om uz tamnu fazu preporuča se za indukciju rizogeneze. Smanjenje koncentracije soli, povećanje sadržaja saharoze, dodavanje aktivnog ugljena i vermikulita u medij bez hormona predstavljaju odlučujuće čimbenike u poboljšanju uspješnosti rizogeneze. Postupak aklimatizacije oraha vrlo je težak zbog brzog propadanja presadnica i njihove osjetljivosti na bolesti uslijed visokog sadržaja vlage tijekom faze rizogeneze. Uspostavljanje tekuće kulture (TIB/TIS sustavi) daje nekoliko drugih prednosti te je važan korak u automatizaciji samog procesa mikropropagacije oraha.

Ključne riječi: orah, mikropropagacija, *in vitro*, hranjivi medij, hormoni

41 stranica, 6 tablica, 8 slika, 100 literaturnih navoda
Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture

BSc Thesis

Micropropagation of walnut (*Juglans regia* L) *in vitro*

Silvija Pejić

Summary: The most common problem in micropropagation of walnuts is browning of the nutrient medium. The influence of genotype is also significant. The most suitable medium for walnut is DKW medium with a sucrose concentration of 3%. BAP, IBA and GA_3 have a positive effect on embryo germination, callus development and bud proliferation. Agar is most often used as a solidifying agent. Ambient light conditions of 1000 to 3000 lux (approx. 40 - 92 μmol/m^{-2}/s^{-1}) and temperatures ranging from 22 to 28 °C are most commonly used in walnut tissue culture. Rooting of microshoots can be achieved in *in vitro* and *ex vitro* conditions. Pre-treatment with IBA in dark phase is recommended for induction of rooting. Decreasing the salt concentration, increasing the sucrose content, adding activated charcoal and vermiculite to the hormone-free medium are importand factors in improving the performance of rhizogenesis. The process of walnuts acclimatization is very difficult due to the rapid decay of seedlings and their susceptibility to disease due to the high moisture content during the rhizogenesis phase. Establishing a liquid culture (TIS/TIB systems) provides several other advantages and is an important step in automating of walnut micropropagation process.

Keywords: walnut, micropropagation, *in vitro*, nutrient medium, hormones

41 pages, 6 tables, 8 figures, 100 references
BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

2. MATERIJAL I METODE.....2

3. REZULTATI I RASPRAVA.....3

3.1. Metode i problemi u razmnožavanju oraha…….....4

3.1.1. Posmeđenje hranjivog medija.....5

3.2. Mikropropagacija…….....6

3.2.1. Uspostavljanje aseptične kulture……..9

3.2.2. Multiplikacija izdanaka.....12

3.2.3. Vrsta/genotip/kultivar……..12

3.2.4. Hranjivi medij……..12

3.2.5. Ugljikohidrati……..15

3.2.6. Biljni regulatori rasta…….15

3.2.7. Sredstvo za geliranje (učvršćivanje) medija……..22

3.3. Okolišni čimbenici *in vitro* kulture oraha…….....24

3.3.1. Svjetlost……..24

3.3.2. Temperatura…….....24

3.4. Rizogeneza mikroizdanaka…….....27

3.4.1. In vitro rizogeneza mikroizdanaka 27

3.4.2. Anorganske soli u rizogenezi……..27

3.4.3. Ugljikohidrati i struktura medija u rizogenezi……..27

3.4.4. Aktivni ugljen u rizogenezi…….....28

3.4.5. Biljni regulatori rasta u rizogenezi……...28

3.4.6. Usporedba in vitro i ex vitro rizogeneze……...……29

3.5. Aklimatizacija i prilagodba na supstrat……...…….29

4. ZAKLJUČAK.....30

5. POPIS LITERATURE……...……...32

1. UVOD

Orah (*Juglans regia* L.) prema pulmološkoj klasifikaciji pripada u skupinu lupinastog (orašastog) voća. Orah ima višestruke upotrebne vrijednosti. Smatra se da potječe iz Male Azije. Neka istraživanja pokazuju da se prvo počeo uzgajati u Kini, a zatim se za vrijeme rimskog carstva proširio po Sredozemlju i Europi. Sortiment oraha se vrlo sporo mijenja. U komercijalnoj svjetskoj upotrebi je 200-tinjak sorti. Većina sorti je lokalnog karaktera, a tek manji broj njih predstavlja standard na svjetskoj razini. Europa je najveći potrošač i gotovo 80% svojih potreba nabavlja s drugih kontinenata. SAD i Kina su najveći proizvođači, prate ih Turska, Iran, Australija, Čile, Ukrajina i Moldavija. Organizirana proizvodnja u RH ne postoji. Ona je vrlo raznolika i obilježena brojnim stereotipima za potrebnu agrotehniku. Velika je zastupljenost sjemenjaka, a tek manji broj nasada oraha je podignut cijepljenim (kalemljenim) sadnicama poznatog sortimenta. Zbog šarolikosti naglašena je i smanjena kvaliteta samog ploda, te nedovoljni urodi. Iz tih razloga proizvodnja je često nerentabilna.

Posljednjih godina svjedoci smo velike ekspanzije poljoprivrednih površina pod orahom (prvo mjesto po površinama u RH), većinom nastalo uslijed politike poticanja poljoprivrednih gospodarstava nekom od ponuđenih mjera ruralnog razvoja.

Uslijed navedenog zabilježen je veliki interes proizvođača za certificiranim i zdravim sadnim materijalom. U voćarskoj i rasadničarskoj proizvodnji RH kronično je aktualan problem nedostatka visoko kvalitetnog reprodukcijskog sadnog materijala dok *in vitro* proizvodnja oraha u RH ne postoji. Sadni materijal se uglavnom uvozi, a veliki rizik predstavlja prisutno sivo tržište koje sadni materijal upitnog fitosanitarnog statusa i sortne čistoće.

Cilj ovog završnog rada zamišljen je poput objedinjenja više relevantnih stručnih izvora na dostignuća u pojedinim *in vitro* tehnikama (modelima) mikropropagacije oraha. Detaljno je iznesen pregled korištenih hranjivih podloga, biljnih regulatora rasta (hormona), potrebnih okolišnih (fizikalnih) *in vitro* parametara, ključnih faza mikropropagacije te u konačnici budućnost i perspektive u mikropropagaciji oraha *in vitro* tehnikom.

2. MATERIJAL I METODE

Za izradu ovog završnog rada bilo je potrebno temeljito prikupiti, istražiti i proučiti dostupnu literaturu i podatke vezane za mikropropagaciju oraha. Dostupna literatura različitih autora usko vezana za kulturu tkiva oraha u Hrvatskoj ne postoji. Analizirani su strani stručni i znanstveni časopisi, razne internetske stranice i dostupni interni podaci s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek (FAZOS), Katedra za voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo (*in vitro* – labaratorij za voćarstvo). Kako bi ovaj završni rad bio što realniji i u skladu sa stvarnošću, pri izradi ovoga rada uvelike je pridonio posjet gore navedenom labaratoriju i razgovori s mentorom kojemu je područje interesa upravo *in vitro* tehnologija. U sklopu laboratorija vrše se mnoga *in vitro* istraživanja na raznim voćnim vrstama (malina, borovnica, paulovnija, lijeska, goji, vegetativne podloge za trešnju, višnju, agrume, te voćna kultura koja je i tema ovog završnog rada ORAH). Katedra se bavi znanstveno istraživačkim radom (razvijanjem i poboljšanjem protokola u cilju razvoja oplemenjivačkog i selekcijskog rada u voćarstvu), edukacijom studenata, proizvodnjom sadnog materijala i sekundarnih metabolita. Laboratorij posjeduje svu opremu potrebnu za uspješno provođenje mikropropagacije (laminarni stol/kabinet, autoklav, miješalica, pH metar, sterilizator, pincete, skalpeli, teglice, TIB SETIS® sustav bioreaktora, itd.), matični biljni materijal (matičnjak – prijavljen u centru za rasadničarstvo HAPIH), prostor za aklimatizaciju, klima komoru s kontroliranim uvjetima potrebnim za razvoj biljaka u pojedinim fazama mikropropagacije (Slika 1.). Kako bi ovaj završni rad dao što pregledniju i realniju sliku u *in vitro* mikropropagaciji oraha, pažljivo su analizirana dosadašnja istraživanja, opisane faze i ključni segmenti u kulturi tkiva oraha.

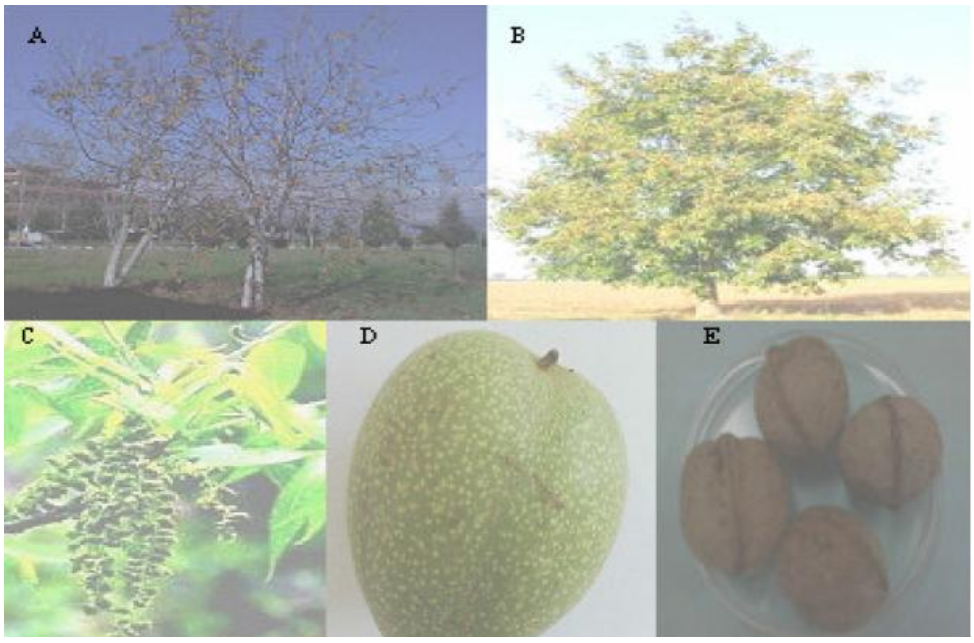
Slika 1. Rad na orahu u labaratoriju za kulturu tkiva, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

3. REZULTATI I RASPRAVA

Orah je klasificiran pod carstvo *Planta*, razred *Magnoliopsida*, red *Fagales*, porodica *Juglandacea* i rod *Juglans*. Rod *Juglans* L. sastoji se od 21 vrste.

Juglans regia L. (Perzijski orah; McGranahan i Leslie, 1990.), *Juglans nigra* L. (crni orah; Funk, 1979.), *Juglas cinerea* L. (sivi orah; McDaniel, 1979.) predstavljaju važne vrste prvenstveno namijenjene za komercijalnu proizvodnju plodova. *Juglans nigra* L. i *J regia* L. koriste se i u proizvodnji drvne masu te predstavljaju ekološki značajne vrste. Ova monoecijska stabla porijeklom su iz Sjeverne, Južne Amerike te iz jugoistočne i istočne Azije (Bailey i Bailey, 1976.). Manning (1976.) podijelio je rod *Juglans* u 4 sekcije:

1) Cardiocaryon Dode - sadrži tri vrste porijeklom iz Kine, Koreje i Japana. (*J. ailantifolia* Carr, *J. manshurica* Maxim i *J.catheyensis* Dode).
2) Trachycaryon Dode ex Mann - sadrži jednu vrstu, *J. cinerea* koja je porijeklom iz Sjeverne Amerike.
3) Rhysocaryon Dode - sa 16 vrsta porijeklom iz Sjevere, Srednje i Južne Amerike te Zapadne Indije.
4) Dioscaryon Dode - s jednom vrstom, *J. regia* porijeklom iz Europe te se proteže do himalajskih planina.



Slika 2. Morfološke karakteristike *Juglans regia* L. – A i B vigor stabla, C muški cvjetovi, D i E nezreli i zreli plodovi, (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011.)

Orah predstavlja nutritivno bogatu namirnicu u ljudskoj ishrani, a koristi se i zbog visoko vrijedne i kvalitetne drvne mase. Plodovi i listovi koriste se u farmaciji. Orah je vrlo bogat proteinima, mastima i mineralima (Kaur i sur., 2006.; Ostry i Pijut, 2000.; Gunes,1999.). Vlažna, bogata, brežuljkasta i nagnuta tla najpoželjnija su mjesta za uzgoj iako može uspijevati poprilično dobro i na sušim tlima (Pijut, 1997, 2004.). U protekla tri desetljeća *in vitro* propagacija oraha izazvala je revoluciju u komercijalnim rasadnicima. Perzijski orah (*J.regia* L.) je hortikulturno i uzgojno najrazvijenija vrsta (McGranahan i Leslie, 1990.) (Slika 2). Crni orah *(J. nigra* L.) vrlo je cijenjen u proizvodnji drvene mase posebice Sjedinjenim Američkim državama (Williams, 1990.), a uzgaja se i za konzumaciju (plodovi). Sivi orah (*J. cinerea* L.) jednako se vrednuje ekonomski i ekološki, odnosno za drvo i za plodove. Plodovi su važni u ishrani mnogih životinjskih vrsta, a drvna masa je utrživa i ima višestruku primjenu (namještaj, ormari, obloge). U područjima svijeta gdje postoji proizvodnja, sivi orah zauzima 8 mjesto od 28 vrsta namijenjenih proizvodnji drvne mase (Peterson, 1990.).

3.1. Metode i problemi u razmnožavanju oraha

Orah se obično razmnožava sjemenom, a dormantnost embrija glavno je ograničenje u širenju i razvoju kultivara putem hibridizacije. Dormanca se može prekinuti jesenskom sjetvom ili vlagom, odnosno pred hlađenjem sjemena na 3 - 5 ^{o}C tijekom 3 - 4 mjeseca. Ova tehnika još uvijek rezultira niskim postotkom klijanja sjemena, a dokazana je i mogućnost transmisije raka oraha putem sjemena (Orchard, 1984.). Primjena metode regeneracije biljaka iz embrija *in vitro* omogućuje savladavanje barijere u hibridizaciji te u konačnici dobivanje brze i masovne multiplikacije elitnih genotipova oraha. Zbog njihove juvenilne prirode, embriji imaju velik potencijal regeneracije te se mogu koristiti u *in vitro* razmnožavanju (Kaur i sur., 2006.). Uspješnost intra i interspecies cijepljenja vrlo je divergentna (Kaeiser i Fuk, 1971.; Xi i Ding, 1990.). Orah se može razmnožavati cijepljenjem na podlogu crnog oraha, ali s ograničenim uspjehom. Najpopularniji način razmnožavanja oraha je cijepljenje koje zahtjeva intenzivan rad, dugotrajan je i skup. Vegetativno razmnožavanje reznicama vrlo je teško zbog niske sposobnosti rizogeneze (McGranahan i sur., 1988.; Land i Cunninham,1994.). Neki autori (Rodriguez i sur., 1989., Chenevard i sur., 1997.) apostrofiraju da je mikropropagacija oraha još uvijek aktualan i neriješen problem te da su glavni razlozi često nepravilna i niska stopa rizogeneze te

visoka smrtnost ukorijenjenih biljaka u fazi aklimatizacije. Ranija istraživanja (Claudet i sur., 1992.; Yalcin., 1993a.) ukazuju kako sklerenhim koji okružuje floem sprječava rizogenezu korijena. Jay-Allemand i sur., (1995.) ukazali su na važnost junglona (5-hidroksi-1.4-naftalin) koji ima glavnu ulogu u indukciji adventivnog korijena u ranoj fazi rizogeneze, također postoji i pozitivna korelacija između koncentracije junglona i kapaciteta ukorjenjivanja *in vitro* mikroizdanaka. Proučavane su mnoge tehnike i načini ukorjenjivanja pojedinih vrsta koje se teško ukorjenjuju (Chelawant i sur.,1995.; Stephans i sur., 1990.; Heloir i sur., 1996.), ali bez značajnih postignuća u poboljšanju. Somatska embriogeneza učinkovita je metoda brzog razmnožavanja i vrlo važan alat u poboljšanju genetike oraha (Robacker, 1993.).

3.1.1. Posmeđenje hranjivog medija

Posmeđenje hranjivog medija rezultat je oksidacije polifenola izlučenih iz rezne površine na eksplantatu, a može se prevladati dodavanjem tvari kao što su polivinil pirolidon (PVP), limunska kiselina, askorbinska kiselina, aktivni ugljen, tiourea, L-cistein, glutamin, asparagin, arginin, učestala subkultivacija (Rout i sur., 1999.; Pierik., 1987.). Inkubacija kulture nakon inicijacije u tamu (mrak) na dan ili dva pozitivno utječe na smanjenje posmeđenja. Utvrđeno je da se polifenol oksidaza aktivira uslijed svijetla (Pittet i Moncousin, 1981.). Curir i sur., (1986.) postavili su kulturu na mediju s aktivnim ugljenom tijekom 3 dana te potom uspješno subkultivirali na svježi mediji. Orah otpušta nekoliko fenolnih spojeva u medij, uključujući i alelokemijski spoj junglon koji ometa rast stanica (Rietvel, 1982 i 1983.). Tjedni transfer ili prebacivanje nodijalnih segmenata na svježi hranjivi mediji neophodan je kako bi se uspostavio optimalni rast i limitirao nastanak fenolnog eksudata u hranjivom mediju. Nastanak eksudata iz svježe kultiviranih eksplantata riješen je učestalim prebacivanjem istih na svježi medij (Preece i sur., 1989.; Leslie i McGrenahan, 1992.). Kako bi smanjili eksudaciju Driver i Kuniyuki, (1984.) i McGranahan i sur., (1988.) premještali su eksplantate na svježi mediji 1, 3, 5 i 8 dana nakon inicijacije. Long i sur., (1995.) odstranili su testu (ovojnicu) s dijelova kotiledona kako bi reducirali letalno posmeđenje. Inicijalne transfere eksplantata u cilju redukcije mogućeg inhibicijskog učinka tamnog eksudata koji se akumulira u hranjivom mediju iznose Preece i Compton, (1991.).

U istraživanju Payghamzadeh i Kazemitabar, (2008b.) eksplantati su kultivirani na dvije vrste hranjivog medija. Prvi medij je sadržavao različite koncentracije 6-benzil aminopurina (BAP), te dvofazni medij (Slika 3.) s nižom fazom koja je sadržavala aktivni ugljen bez biljnih regulatora, i gornja faza tekući DKW medij dopunjen različitim koncentracijama BAP-a bez aktivnog ugljena. Rezultati ukazuju da je koncentracija od 8.9 µM BAP-a bila najučinkovitija u indukciji aksilarnih pupoljaka. Također dvofazni medij bio je bolji u odnosu na ostale medije tijekom istraživanja.

Slika 3. Dvofazni medij - gornja faza tekuća s aktivnim ugljenom i donja faza hranjiva podloga sa svim elementima, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

3.2. Mikropropagacija

Mikropropagacijom u odnosu na konvencionalne metode vegetativnog razmnožavanja stvaramo veliki broj genetski identičnih biljaka u kratkom vremenskom razdoblju neovisno o sezonskoj dinamici. Istraživanja na mikropropagaciji oraha sažeti su u tablici 1. Izbor eksplantata za inicijaciju *in vitro* kulture diktira daljnju metodu (tehniku) *in vitro* razmnožavanja (Slika 4.). Juvenilni eksplantati oraha pogodni su za indukciju somatske embriogeneze, kalusa, korijena, germinaciju i organogenezu izdanaka.

Istraživanja na *in vitro* kulturi oraha usmjerena su na nekoliko različitih biotehnoloških pristupa i vrsta eksplantata (Tablica 1). Napredak u razvoju tehnike *in vitro* kulture *Juglans spp.* i hibrida vrlo je uspješan u proteklih dvadesetak godina. Presadnice su dobivene putem multiplikacije izdanaka, nodijalnih segmenata i somatske embriogeneze. Međutim, objavljeno je tek nekolicina istraživačkih radova na mikropropagaciji *Juglans spp.* L.

Tablica 1. Sažetak *in vitro* istraživanja na *Juglans spp.* L., (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011.).

Vrsta/Kultivar	Eksplantat	Metoda	Referenca
***J. nigra* L.**	Izdanci, listovi	Mikropropagacija/ rizogeneza	Roschke i Pijut (2006.)
***J. regia* L.**	Embrij	Mikropropagacija/ usporedba medija	Payghamzadeh i Kazemitabar (2008a.)
***J. regia* L.**	Kotiledoni	Somatska embriogeneza	Payghamzadeh i Kazemitabar (2008d.)
***J. regia* L.**	Kotiledoni	Adventivna regeneracija/ somatska embriogeneza	Long i sur., (1995.)
***J. regia* L. podloga cv. Perlata**	Plod	Kultura embrija/ germinacija embrija i razvoj biljaka	Sanchez-Zamora i sur., (2006.)
***J. regia* L. cv SU-2**	Embrij	Klijanje somatskih embrija / germinacija embrija	Dumanogole (2000.)
***J. regia* L.**	Plod	Mikropropagacija/ zametanje embrija, cjelokupni razvoj biljke	Kaur i sur., (2006.)
***J. cinerea* L.**	Kotiledoni	Somatska embriogeneza; kalus; rizogeneza; klijavost	Pijut (1993ab.)
***J. nigra* L.**	Kotiledoni	Somatska embriogeneza; organogeneza izdanaka	Long i sur., (1992.)
***J. nigra* L.**	Kotiledoni	Somatska embriogeneza; kalus; rizogeneza	Neuman i sur., (1993.)
J. nigra* x *J. major	Kotiledoni	Somatska embriogeneza; interspecies hibridi	Cornu (1988.)
J. nigra* x *J. regia	Embrij	Klice izdanaka	Cornu i Jay-Allemand (1989.)
J. nigra* x *J. regia	Vršni izdanak	Ukorijenjene biljke	Meynier i Arnould (1989.)
J. nigra* x *J. regia	Kotiledoni	Sazrijevanje / klijanje somatskih embrija	Deng i Cornu (1992.)

Interspecies hibridi	Embrij	Ukorjenjivanje mikroizdanaka; biljke	Jay- Allemand i sur., (1992.)
***J. regia* L.**	Kotiledoni	Somatska embriogeneza; biljke	Tulecke i McGranahan (1985.)
***J. regia* L.**	Kotiledoni	Histologija somatskog embrija	Polito i sur., (1989.)
***J. regia* L.**	Embrij; nodijalni segmenti	Izdanci, ukorijenjene biljke	Revilla i sur., (1989.)
***J. regia* L.**	Apikalni i lateralni pupoljci	Formacija izdanaka	Felaliev (1990.)
***J. regia* L.**	Aksilarni pupoljci	Multiplikacija izdanaka; rizogeneza	Stephens i sur., (1990.)
***J. regia* L.**	Neoplođena stanica	Somatsko podrijetlo embrija određeno RFLP i analiza enzima	Aly i sur., (1992.)
Klon TRS	Mikroizdanci	Poboljšana aklimatizacija biljaka	Voyiatzis i McGranahan (1994.)
J. hindsii* x *J. regia	Nodijalni segmenti	Multiplikacija izdanaka; ukorjenjivanje izdanaka	Gruselle i Boxus (1990.)
J. regia* x *J. nigra	Nodijalni segmenti	Pi ishrana i nj. utjecaj na kalus i razvoj izdanaka	Barbas i sur. (1993a.)
J. regia* x *J. nigra	Embrij	Učvršćivač i nj. učinci na rast izdanaka	Barbas i sur. (1993b.)
***J. regia* L.**	Embrij, kotiledoni	Mikropropagacija/ indukcija kalusa, klijavost embrija	Payghamzadeh (2008.)

Mikropropagacija oraha odvija se u nekoliko faza, a svaka sa svojim specifičnim zahtjevima.

(0 faza) brigao o matičnim biljkama i odabir eksplantata

(I faza) uspostavljanje aseptične kulture

(II faza) multiplikacija izdanaka

(III faza) ukorjenjivanje izdanaka

(IV faza) aklimatizacija i transfer biljaka u *ex vitro* uvjete.

3.2.1. Uspostavljanje aseptične kulture

Jedan od najvažnijih čimbenika *in vitro* kulture je uspostavljanje i održavanje aseptičnih uvjeta (Slika 4.). Priprema i sterilizacija eksplantata dosta je problematična i teška. Tkivo (eksplantat) se tretira dezinficijensima u cilju sprječavanja mikrobiološke kontaminacije bez oštećenja tkiva. Na orahu je uobičajen i usvojen postupak površinske sterilizacije eksplantata s 50 - 70% (v/v) etanola (EtOH) kroz 20 - 30 sekundi, a potom slijedi uranjanje eksplantata u 0.1 – 15% (v/v) natrijevog hipoklorita (NaOCl) s dodatkom 0.01% Tween 20 (okvašivač) u trajanju od 10 - 20 min. Potom slijede tri ispiranja (5 min.) u sterilnoj destiliranoj vodi. Tablica 2. prikazuje usvojene protokole sterilizacije za nekoliko vrsta eksplantata oraha.

Slika 4. Aseptični nodijalni eksplantat oraha dobiven u *in vitro* labaratoriju za voćarstvo, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

Tablica 2. Metode sterilizacije eksplantata oraha, (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011.).

Vrsta/Kultivar	Eksplantat	Metoda	Dezinfekcijska sredstva i koncentracije	Metoda	Referenca
***J. regia* L. cv.: ACO38853, Netar Akhort, Gobind, Solding selekcije**	Plod	Kultura embrija	0.1 % natrijev hipoklorit	Plod je opran u vodi pod slavinom. Plod skupa s ljuskom dezinficiran 0.1 % natrijevim hipokloritom, dva ispiranja u sterilnoj destiliranoj vodi (5 min).	Kour i sur., (2006.)
***J. regia* L. cv: Yalova-1, Sebin, Bilecik, KR-1, KR-2, Sen-2, 07-KOR-1, Tokat-1, Kaman-1, Kaman-5**	Plod	Somatska embriogeneza	3.75 % natrijev hipoklorit	Plod steriliziran uranjanjem kroz 25 min u 3.75 % (v/v) natrijev hipoklorit, ispiran 5 min u sterilnoj destiliranoj vodi.	San i Hatic (2006.)
***J. regia* L.**	Izdanci i list	Regeneracija adventivnih izdanaka i mikropropagacija	Za izdanke: 70 % etanol, 15 % otopina za izbjeljivanje Za list: 10 % otopina za izbjeljivanje	Izdanci isprani vodom iz slavine 30 min te izrezani na segmente, slijedi 30 sek u 70 % etanolu, dezinfekcija 20 min u 15 % otopini za izbjeljivanje s dodatkom 0.01 % Tween na magnetnoj miješalici. Ispiranje u sterilnoj vodi četiri puta po 30 sek. Za list: eksplantati isprani u tekućoj vodi iz slavine 5 min, sterilizirani 10 min u 10 % izbjeljivača te isprani četiri puta u sterilnoj vodi.	Roschke i Pijut (2006.)
***J. cinerea* L.**	Nodijalni segmenti	Kultura aksilarnih pupova	0.8 % (v/v) natrijev hipoklorit (15 % izbjeljivač)	S grančica sadnica uklonjeni su listovi te su grančice površinski sterilizirane u 0.8 % (v/v) natrijevog hipoklorita (15 % izbjeljivač Clorox) 15-20 min., nakon toga su četiri puta ispiranje u sterilnoj, deioniziranoj vodi.	Pijut (1997.)

***J. regia* L. kultivari: Plemiana 1 i Plemiana 2**	Jezgra	Kultura embrija	NaOCl (1.0 % v/v), 75 % v/v EtOH	Jezgra uronjena u NaOCl (1.0 % v/v) na 5 min, slijedi uranjanje u 75 % v/v EtOH na 5 min te ispiranje tri puta u sterilnoj destiliranoj vodi.	Scaltsoyiannes i sur., (1997.)
***J. nigra* L**	Kotiledoni	Adventivna regeneracija	5.25 % NaClO; 70 % EtOH; HCl 0.01 N	Nezreli plod površinski se dezinficira neposredno nakon sakupljanja kroz 1 min u 70 % (v/v) etanolu. Nakon čega slijedi 5min u 5.25 % NaOCl. Ispiranje od 1 min. u sterilnoj deioniziranoj vodi, 1 min u 0.01 M HCl i tri puta po 5 min u sterilnoj deioniziranoj vodi.	Long i sur., (1995.)
***J. regia* L. podloga cv. Peralta**	Plod	Mikropropagacija Kultura embrija	0.5 % NaOCl, 75 % EtOH 10 % otopina Domestos, 70 % etanol	Sjeme prethodno uronjeno 24 h u vodu i dezinficirano 5 min u 0.5 % otopini NaOCl nakon čega slijedi 5 min u 75 % etanolu i 3 ispiranja u sterilnoj destiliranoj vodi. Plodovi sakupljeni u listopadu i sterilizirani u 10 % otopinom Domestos-a kroz 2h, (otopina je mijenjana svakih 30 min). Nakon vađenja i otvaranja ploda do jezgre, donja polovica kotiledona je odstranjena. Embriji su dezinficirani u laminarnoj komori tijekom 2 min u 70% etanolu i 20 min u 20 % Domestos-a uz tri ispiranja sterilnom vodom.	Revilla i sur., (1989.) Sánchez-Zamora i sur., (2006.)
***J. regia* L.**	Embrionalni vrhovi	Morfološko istraživanje i kultura embrija	Alconox (0.1%), NaOCl(5 g/1)	Embrionalni vrhovi iz sjemena izolirani i sterilizirani namakanjem u alconox (0.1%) 10 min, isprani s destiliranom vodom 10 min, natopljeni s NaOCl (5 g/1) i isprani 3 puta s destiliranom vodom.	Fernandez i sur., (2000.)
***J. regia* L.**	Nedozreli plodovi	Indukcija kalusa iz nezrelih embrija	Natrijev hipoklorit 3.75%; EtOH 50%	Nedozreli plod sakupljen 6 tjedana nakon cvatnje te ispran pod vodom iz slavine kroz 30 min. Zatim tretiran 30 s u 50 % EtOH, dezinficiran 20 min u 3.75 % otopini natrijevog hipoklorita i 0.01% Tween 20. Uzorci 5 puta isprani u sterilnoj destiliranoj vodi.	Payghamzadeh (2008.)

3.2.2. Multiplikacija izdanaka

Proliferacija aksilarnih pupova uspjela je na Driver i Kuniyuki (DKW) mediju dopunjenom s 8.9 mM BAP (Payghamzadeh i Kazamitabar, 2008b.). Chalupa (1981.) iznosi uspješnu elongaciju aksilarnih pupoljka iz nodijalnih segmenata *J. regia* L. koji su bili inicirani na Murashige i Skoog (MS) medij dopunjen s 0.4 μM BAP i 0.8 μM naftil octene kiseline (NAA). Gruselle i sur., (1987.) na modificiranom MS mediju s 4.4 i 8.9 μM BAP također su uspjeli dobiti kulturu iz nodija *J. regia* L. Pujit (1997.) iznosi slične rezultate na crnom orahu gdje je došlo do povećanja korijena, ali bez utjecaja na daljnji rast izdanaka (elongaciju). Različiti čimbenici koji utječu na *in vitro* multiplikaciju izdanaka navedeni su u nastavku.

3.2.3. Vrsta/genotip/kultivar

Scaltsoyiannes i sur., (1997.) istaknuli su značajan utjecaj genotipa na *in vitro* razmnožavanje oraha. Promatrali su razlike između stope multiplikacije kod 12 različitih klonova oraha. Utjecaj genotipa bio je značajan u fazi rizogeneze. Neki klonovi pokazali su visoku sposobnost rizogeneze (95%) dok je kod nekih bila vrlo niska (5%). Između klonova uočene su i značajne razlike u stopi multiplikacije. U istraživanju Payghamzadeh i Kazemitabar, (2010a.) na kulturi embrija kod osam kultivara koji su bili inicirani na DKW medij, većina ih se razvila u presadnicu te je primijećeno kako različiti kultivari imaju drugačije zahtjeve prema regulatorima rasta. Najveći postotak klijavosti embrija postigli su kultivari Chandler, Serr, Hartky, Rentegnomushak te lokalni kultivari. Kaur i sur., (2006.) istraživali su germinaciju embrija na pet kultivara oraha (*J. regia* L.): ACO 38853, Netar Akhrot, Gobind, Solding selekcija i Blackmore. Uočene su značajne razlike između svih pet kultivara, a Netar Akhrot imao je najveći postotak germinacije. Pojedina istraživanja ukazuju kako postoje geni odgovorni za povećanje proliferacije pupova i izdanaka (Tantikanjana i sur., 2001.).

3.2.4. Hranjivi medij

Hranjivi medij jedna je od najvažnijih komponenti u kulturi tkiva. U mikropropagaciji oraha koriste su različiti hranjivi mediji u fazi proliferacije eksplantata o čemu apostrofira Jay-Allemand (1982.). On je koristio primarnu kulturu na pola koncentracije Knop´s

medija, a sekundarnu na Miller mediju s 1 mg/l BAP-a. Murashige i Skoog (1962.) MS mediji i Driver i Kuniyuki (1984.) DKW medij najčešće su korišteni u mikropropagaciji oraha. Sastav (mg/l) svakog hranjivog medija koji se koristi u *in vitro* kulturi oraha naveden je u Tablici 3.

Tablica 3. Koncentracije mikro/makro soli, vitamina i šećera (mg/l) pojedinih hranjivih medija u mikropropagaciji oraha.

Komponente medija (soli i vitamini)	**MS**	**DKW**	**WPM**	**NGE**	**B5**	**LP**
NH_4NO_3	1650	1416	400	908	-	908
KNO_3	1900	-	-	723	2500	-
$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	-	1968	556	2248	-	1262
$CaCl_2 \times 2H_2O$	440	149	96	699	150	122.2
K_2SO_4	-	1559	990	-	-	1274.5
$MgSO_4 \times 7H_2O$	370	740	370	2053	250	555
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	134	-
$MnS0_4 \times H_2O$	-	-	-	-	10	27.9
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	-	-	150	-
KH_2PO_4	170	265	170	155	-	217.5
$MnSO_4 \times 4H_2O$	22.3	33.5	22.3	22.3	-	-
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	0.25	0.39	0.25	0.25	0.25	0.32
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	8.6	-	8.6	8.6	2	4.3
$Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$	-	17	-	-	-	8.5
KI	0.83	-	-	0.83	0.75	-
H_3BO_3	6.2	4.8	6.2	6.2	3	5.5
$CuSO_4 \times 5H_2O$	0.025	0.25	0.25	0.025	0.025	0.25
$CoCl \times 6H_2O$	0.025	-	-	0.025	0.025	-
$NiSO_4 \times 6H_2O$	-	0.005	-	-	-	-
$FeSO_4 \times 7H_2O$	27.8	33.8	27.8	27.8	-	30.8
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	37.3	45.4	37.3	37.3	37.3	41.35
Myo-inositol	100	100	100	100	100	100
Tiamin-HCl	0.1	2	1	0.1	10	1.5
Nikotinska kiselina	0.5	1	0.5	0.5	1	0.75
Piridoksin-HCl	0.5	-	0.5	0.5	1	0.25
Glicin	2	2	2	2	-	2
Glutamin	-	-	2	-	-	-
Šećer	30000	30000	30000	30000	20000	30000

U prvim pokušajima mikropropagacije oraha koristile su se postojeće formulacije medija koje su bile prikladne za druge drvenaste kulture. Uporabom Driver i Kuniyuki (1984.), Cheng (Cheng, 1975.), Murashige i Skoog (MS) (Murashige i Skoog, 1962.), B5

(Gamborg i sur., 1968.) i WPM (Lloyd i McCown, 1981.) primijećen je problem u vidu pogoršanja kulture nakon određenog perioda.

Ovaj problem doveo je do razvoja novog DKW medija (McGranahan i sur., 1987.) posebno optimiziranog na hibridu oraha Paradox koji se koristi kao vegetativna podloga za današnje intenzivne kultivare. Iako je DKW medij razvijen za Paradox, pokazao se prikladnim i za razne druge vrste *Juglandaceae*, uključujući i *J. regia* L. te trenutno predstavlja najčešće korišteni medij u kulturi tkiva oraha (Cornu i Jay-Allemand, 1989.; McGranahan i sur., 1987.; McGranahan i Leslie, 1987.; Payghamzadeh, 2008.) (Slika 5.). Međutim, nekolicina istraživača ukazuje i na potencijal MS medija u kultivaciji perzijskog oraha (Revilla i sur., 1989.; Penuela i sur., 1988.; Kornova i sur., 1993.; Gruselle i Boxus, 1990.; Payghamzadeh, 2008.). Saadat i Hennerty (2002.) apostrofiraju da je perzijskom orahu za multiplikaciju potrebno puno soli te je s toga upravo DKW medij vrlo prikladan. DKW hranjivi medij ima relativno veliku koncentraciju soli isto kao i MS koji u svojem sadržaju ima visok sadržaj dušika, te sadrži i visoke koncentracije nekih drugih iona. Za razliku od DKW i MS medija, WPM je medij s niskom koncentracijom soli i loš je za orah. Saadat i Hennerty (2002.) iznose nesignifikantnu razliku u izdancima i svježoj masi kalusa te duljini izdanaka na DKW i MS mediju, ali oba su bila značajno bolja u odnosu na WPM. Ovo potvrđuje rezultate Driver i Kuniyuki (1984.) da je DKW medij superiorniji od WPM u mikropropagaciji hibrida Paradox. Heile-Sudholt i sur., (1986.) iznose rezultate na crnom orahu gdje su aksilarni izdanci bili značajno veći, zeleniji i s više listova na DKW u odnosu na WPM.

Slika 5. Komponente DKW medija, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

WPM mediji ima nisku koncentraciju nitrata što je možda dovelo do dodatnog metaboličkog stresa. Mnoge komponente WPM medija koje nisu prisutne u MS također izazivaju stres u biljnim stanicama. Uključivanje kobalta (nedostatak nikla) u mediju pridonijelo je oštećenju lišća i metaboličkom stresu biljnog tkiva krumpira (Witte i sur., 2002.). WPM ne sadrži nikal niti kobalt. MS sadrži kalijev jodid (KI), dok WPM ne uključuje izvor joda. KI je bio toksičan na stanice *Haplopappus gracilis* kultivirane u tamnim uvjetima (Eriksson, 1965.). Payghamzadeh i Kazemitabar (2008a.) usporedili su učinke MT medija s modificiranim DKW medijem, te utvrdili da je postotak germinacije i proliferacije embrija na modificiranom DKW mediju bila veća. Institut Murciano de Investigacióny Desarrollo Agrarioy alimentario (IMIDA) s timom za voćarstvo dizajnirao je novi medij za germinaciju embrija oraha (NGE) (Sanchez-Zamora i sur., 2006.). NGE i WPM jedini su inicirali biljke sa stabljikama, ali ne i korijenjem. No unatoč svemu navedenom DKW medij se pokazao najpogodniji (u mnogim slučajevima i superioran) za kulturu tkiva *J. regia* L. ali i druge vrste *Juglans* (Driver i Kuniyuki, 1984.; Heile-Sudholt i sur., 1986.; Lee i sur., 1986.; McGranahan i sur., 1988.; Leslie i McGranahan, 1992.).

3.2.5. Ugljikohidrati

Izvor ugljikohidrata u mediju najčešće je saharoza (šećer). Murashige i Skoog (1962.) su utvrdili da je uporaba 3% saharoze bolja u odnosu na 2 ili 4%. Mnogi istraživači drže se upravo ove preporučene koncentracije od 3 %.

3.2.6. Biljni regulatori rasta

U tablici 4. nalazi se pregled biljnih regulatora rasta (PGR – *engl.* Plant Growth Regulator) koji se koriste u *in vitro* propagaciji oraha. Uključivanje BAP-a i gibrelinske kiseline (GA_3) u medij bilo je ključno u proliferaciji pupova i germinaciji embrija oraha. Uporaba 2 mg/l GA_3 dovodi do pojačane germinacije embrija (Payghamzadeh, 2008; Payghamzadeh i Kazemitabar, 2008a). Uključivanje 2 mg/l 2.4-diklorofenoksioctene kiseline (2.4-D) u kombinaciji s 1 mg/l BAP-a rezultiralo je najučinkovitijom embriogenezom (Payghamzadeh, 2008.; Payghamzadeh i Kazemitabar, 2010b.). Koncentracija BAP-a od 8,9 μM najbolja je u indukciji bočnih pupoljaka (Payghamzadeh i Kazemitabar, 2008b). Fernandez i sur., (2000.) ispitivali su učinak pojedinog medija, omjer auksina/citokinina i fotoperiod na organogenezu, indukciju kalusa, staničnu suspenziju i proliferacije pupova iz kulture embrija na *J. regia* L. Iznose da se duljina izdanaka smanjila pri koncentraciji NAA

od 1 mg/l i IBA 8 mg/l. Isto tako niže koncentracije auksina nisu doprinijele u povećanju dužne izdanaka. Koncentracija NAA ili IBA veća od 2 mg/l inicirala je korijenje, ali se dužina korijena smanjila s povećanjem koncentracije auksina. IBA je bila učinkovitija u rizogenezi u odnosu s NAA. Dodavanjem IBA-e u koncentraciji od 1 ili 2 mg/l dolazi do formiranja sekundarnog korijenja. Također, dodavanjem IBA-e inicirano je dugo i tanko korijenje, a na NAA kraće i deblje. Nije zabilježena značajna razlika u svježoj masi korijena između tretmana.

Roschke i Pijut (2006.) iznose od šest genotipova *J. nigra* L. koji su bili kultivirani na različitim kombinacijama tidiazurona (TDZ) i IBA-e, tek su tri (D, E, F) pokazala sposobnost regeneracije adventivnih izdanaka. Uporabom 6.8 µM TDZ i 1.0 µM IBA-e genotip D regenerirao je 60 % eksplantata (najveća stopa od svih genotipova). Genotip F rezultirao je 10 %-tnom regeneracijom izdanaka na istom mediju, ali i na mediju s 6.8 µM TDZ i 0µM IBA-e na kojem je i genotip E razvio 10 % regeneriranih eksplantata. Christianson i Warnick (1987.) apostrofiraju kako organogenezu izdanaka sljeduju tri fiziološke faze: stjecanje kompetencija za indukciju, indukcija i morfološka diferencijacija uz rast. Cornu (1988.) opisuje somatsku embriogenezu, ali ne i organogenezu na *J. nigra* L. Neuman i sur., (1993.) iznose neuspješnu organogenezu izdanaka u svojem istraživanju na eksplantatima uporabom WPM-a s 2.4-D i TDZ.

Somatska embriogeneza predstavlja temelj u genetskoj transformaciji nekoliko ekonomski važnih vrsta. Tulecke i sur., (1995.) koristili su kotiledone u somatskoj embriogenezi, a medij je bio oplemenjen različitim koncentracijama PGR-ova. Plodovi su prikupljeni u 8 - 12 tjednu nakon cvatnje (najbolji period za izbor eksplantata). Tulecke i McGranahan (1985.) iznose da je optimalna faza razvoja kotiledona za indukciju somatske embriogeneze 6 – 11 tjedana nakon oprašivanja. Pijut (1993.) sugerira da je najveći (42 – 56 %) razvoja somatskih embrija na sivom orahu kod onih koji se prikupljaju u 9 ili 8 tjednu nakon cvatnje. Pijut (1997.) iznosi najviše embriogenih kotiledona postignuto u 8 tjednu nakon cvatnje. Payghamzadeh i Kazemitabar (2008d) iznose najveću embriogenezu kotiledona na mediju s 2 mgl/1 2.4-D i 1 mg/l BAP.

In vitro kultura embrija često se koristi u mikropropagaciji mnogih biljnih vrsta uključujući i orah (Ramming, 1990.; Cossio i. Minotta, 1983.; Raghavan 1977 i 1980.).

Slika 6. Shematski prikaz kulture embrija (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011.)

Opis postupka *in vitro* tehnike kulture embrija (Slika 6.): 1. Prikupljeni plodovi; 2. pranje pod tekućom vodom 10 min; 3. tretiranje plodova s otopinom za izbjeljivanje (NaOCl) kroz 10 min; 4. pranje pod tekućom vodom kroz 10 min; 5. tretiranje s 50 – 70 % (v/v) etanolom kroz 20 - 30 s nakon čega slijedi sterilizacija s 0.1 – 15 % (v/v) natrijevim hipokloritom uz dodatak 0.01 % Tween 20 kroz 10 - 20 min; 6. ispiranje u tri sterilne destilirane vode u aseptičnim uvjetima; 7. laminarna komora (aseptični uvjeti); 8. plodovi se otvaraju pomoću sterilnih skalpela i pinceta; 9. disekcija embrija s kotiledonima; 10. embriji kultiviran na hranjivi medij; 11. *in vitro* germinacija embrija; 12. aklimatizacija *in vitro* biljaka nastalih iz embrija.

Nekoliko čimbenika utječe na klijanje embrija oraha, a to su: biljni regulatori rasta, hranjivi medij i okolišni čimbenici. BAP i IBA imaju pozitivan utjecaj na klijanje embrija kod svih kultivara. Značajno veći ($p<0.01$) postotak klijavosti zametaka dobiven je uporabom 1 do 1.5 mg/l BAP i 0.05 do 0.1 mg/l IBA. Payghamzadeh i Kazemitabar (2010a.), uočili su značajne razlike između hranjivih medija, koncentracije GA_3 i okolišnih čimbenika. Postotak klijanja embrija i duljina glavnog izdanka bila je veća na modificiranom DKW mediju u tamnoj fazi s 2 mg/l GA_3. U ovom istraživanju GA_3 je imao negativan učinak na rast korijena, odnosno dužina korijena na 0 mg/1 GA_3 bila je veća u odnosu na tretman s 2 mg/l GA_3.

Kod oraha auksini i citokinini su odgovorni za indukciju kalusa (Slika 7.). Svježa tvar kalusa ovisila je o BAP-u i koncentraciji indol-3-maslačne kiseline (IBA). U početku kalus je bio zelen i nodularan ali je kasnije postao smeđ i odumro pri koncentraciji od 0.1 mg/1 IBA i 1.5 mg/1 BAP-a. U konačnici koncentracija od 0.01 i 0.1 mg/1 IBA s 1.5 mg/1 BAP pospješuje indukciju kalusa iz embrionalnih tijela (Payghamzadeh i Kazemitabar, 2010a). Kalus u ovom istraživanju je bio bijel te je vrlo sporo rastao. Pokušaji regeneracije izdanaka ili somatskih embrija iz ove vrste kalusa do sada su neuspješni.

Slika 7. Kultura kalusa oraha (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011)

Tablica 4. Najčešće korišteni fitohormoni, mediji i tipovi eksplantata u *in vitro* kulturi oraha, (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011.).

Vrsta/ Kultivar	Biljni regulatori rasta								Metoda	Mediji	Eksplantat*	Referenca
	BAP	Kn	TDZ	2.4-D	IBA	IAA	NAA	GA_3				
***J. cinerea* L.**	-	-	-	-	2.5 µM	-	-	-	Rizogeneza	1/2 MS	MI	Pijut (1997.)
***J. cinerea* L.**	8.9 µM	-	-	-	-	-	-	-	Kultura aksilarnih pupova	MS	NS	Pijut (1997.)
***J. regia* L.**	-	-	-	-	3 mg/l	-	-	-	Rizogeneza izdanaka	DKW	I	Heloir i sur., (1996.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	Aksilarna proliferacija izdanaka	MS	I	Heloir i sur., (1996.)
***J. nigra* L.**	1-5 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	Proliferacija pupova	MS ili DKW	-	Sommers i sur., (1982.)
***J. regia* L.**	1 mg/	-	-	-	0.01 mg/	-	-	-	Multiplikacija izdanka	DKW, MS i WPM	VI	Saadat i Hennerty (2002.)
***J. regia* L.**	-	-	6.8 µM	-	1 µM	-	-	-	Regeneracija adventivnih izdanaka	DW (1/2 DKW+1/2 WPM)	L	Roschke i Pijut (2006.)
***J. regia* L.**	4.44 µM	-	-	-	0.005 µM	-	-	-	Multiplikacija izdanaka	DKW	GE	Jay-Allemand i sur., (1992.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	Multiplikacija izdanaka i indukcija rizogeneze	MS	EJE	Penula i sur., (1988.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	2 mg/l	-	-	0.01 mg/l	-	-	-	Makro morfološka i histološka analiza	Modificirani MS	SP	Rodriguez i sur., (1993.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	-		-	0.1 mg/l	0.05mg/l	-	0.1mg/l	Mikropropagacija	MS	JNS, EV	Revilla i sur., (1989.)

***J. regia* L.**	4.4, 8.9 µM	-	-	-	-	-	-	-	Kultura nodijalnih segmenata	Modificirani MS	NS	Gruselle i sur., (1987.)
***J. regia* L.**	0.4 µM	-	-	-	-	-	0.8 µM	-	Elongacija aksilarnih pupova	MS	NS	Chalupa (1981.)
***J. nigra*. L.**	-	-	5 µM	0.1 µM	-	-	-	-	Adventivna regeneracija	WPM	-	Long i sur., (1995.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	-	-	-	0 - 0.1-0.05 mg/l	-	-	-	Mikropropagacija	DKW	C	Payghamzadeh (2008.)
***J. regia* L.**	-	-	-	-	-	-	-	2 mg/l	Mikropropagacija	DKW Mt	E	Payghamzadeh i Kazemitabar (2008c.)
***J. regia* L.**	0.5 mg/l	0.5 mg/l	-	-	-	-	-	2 mg/l	Kultura embrija	MS	E	Kaur i sur., (2006.)
***J. regia* L.**	-	0.3 mg/l	-	1 mg/l	2 mg/l	-	2 mg/l	-	Indukcija kalusa	MS ili K(h)	EV	Fernandez i sur., (2000.)
***J. regia* L.**	0.5 - 2 mg/	-	-	-	-		0.1 - 0.5 mg/l	0.1 - 0.5 mg/l	Kultura embrija	MS	E	Liu i Han (1986.)
***J. regia* L.**	4.44 µM	-	-	-	-	-	-	-	Mikropropagacija	DKW	E	Jay-Allemand i sur., (1992.)
***J. regia* L.**	0.1 - 1 mg/	-	-	-	-	-	-	-	Proliferacija aksilarnih pupoljaka	MS	EV	Fernandez i sur., (2000.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	-	-	-	-	-	-	-	Proliferacija embrija	1/2 Knop, Miller	E	Jay-Allemand (1982.)
***J. regia* L., cv SU-2**	-	-	-	-	-	-	-	9 mg/l	Germinacija embrija	DKW	E	Dumanoglu (2000.)
***J. regia* L., cv Plemiana 1, Plemiana 2**	4.44, 2.22 µM	-	-	-	0.005 µM	-	-	-	Mikropropagacija	DKW	E	Scaltsoyiannes i sur., (1997.)

***J. regia* L. podloga cv. Perlata**	0.5 mg/l	-	-	-	0.1 mg/l	-	-	-	Germinacija embrija	NGE, DKW, WPM	E	Sanchez Zamora i sur., (2006.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	2 mg/l	-	-	0.01 mg/l	-	-	-	Embriogeneza	DKW	C	San i Hatic (2006.)
***J. regia* L.**	4.4 µM	9.3 ili 1.1 µM	-	9.1 µM	0.05 µM	-	-	-	Embriogeneza	DKW ili MS	C	Pijut (1993a.)
***J. regia* L.**	-	-	5 µM	0.1 µM	-	-	-	-	Embriogeneza	WPM	C	Neuman i sur., (1993.)
***J. regia L.*, cv Manregian**	4.4 µM	9.3 ili 1.1 µM	-	9.1 µM	0.05 µM	-	-	-	Embriogeneza	DKW ili MS	ES	Tuleke i sur., (1988.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	2 mg/l	-	-	0.01 mg/l	-	-	-	Embriogeneza	MS	C	Boltivets i Piven (1990.)
***J. regia* L.**	-	-	5 µM	0.1 µM	-	-	-	-	Embriogeneza	DKW	C	Steger i sur., (2003.)
***J. regia* L.**	1 mg/l	2 mg/l	-	-	0.01 mg/l	-	-	-	Embriogeneza	LP	C	Steger i sur., (2003.)

Legenda: eksplantat* / JNS - juvenilni nodijalni segmenti; I - izdanci; VI - vrhovi izdanaka; L - list; NS - nodijalni segmenti; EV - embrionalni vrh; MI - mikro izdanci; GE - germinacija embrija; EJE - embrionalni i juvenilni eksplantati; SP - pupovi na izdancima; E - embrio; ES - endosperm, C - kotiledon.

3.2.7. Sredstvo za geliranje (učvršćivanje) medija

Najčešće se upotrebljava agar (Tablica 5.) zbog svojih poželjnih karakteristika kao što su prozirnost, stabilnost i inertnost (Ibrahim, 1994.). Phytagel i Gelrite alternativna su sredstva za učvršćivanje DKW medija te se sve češće koriste (Pierik, 1987.). Neki istraživači koji koriste DKW medij izbjegavaju upotrebu gelrita zbog njegovog utjecaja na povećanje vitrifikacije (hiperhidriranosti) biljnog materijala.

Cornu i Jay-Allemand (1989.), usporedili su dvije vrste učvršćivača u multiplikaciji izdanaka oraha. Nakon dva transfera, elongacija izdanaka i formiranje kalusa bila je značajno veća na gelritu. Barbas i sur., (1993a.) iznose da je učvršćivač utjecao na rast *in vitro* izdanaka oraha. Gelrite promovira elongaciju izdanaka i produkciju pupova, dok Difco Bacto agar inhibira rast te uzrokuje potpuno sušenja listova s ograničenim formiranjem novih.

Tablica 5. Najčešće korištena sredstva za učvršćivanje medija u *in vitro* razmnožavanju oraha, (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011.).

Vrsta/kultivar	Učvršćivač	Koncentracija	Medij	pH	Metoda	Referenca
***J. cinerea* L.**	Phytagel	0.22 % (w/v)	MS	5.7	Kultura aksilarnih pupoljaka	Pijut (1997.)
***J. cinerea* L.**	Phytagel	0.2 % (w/v)	1/2 MS	5.7	Rizogeneza mikroizdanaka	Pijut (1997.)
***J. cinerea* L.**	Gelrite (Merck Co) ili Difco Bacto agar	0.24 % (w/v), 0.7 % (w/v)	MS ili DKW	5.7	Somatska embriogeneza	Pijut (1993a.)
***J. regia* L.**	Gelrite (Merck Co)	0.21 % (w/v)	DKW	5.7	Somatska embriogeneza	San i Hatic (2006.)
***J. regia* L.**	Agar (India, Himedia, Mumbai)	6 g/l	MS	5.8	Kultura embrija	Kaur i sur., (2006.)
***J. regia* L.**	Difco Bacto agar	8 g/l	MS, DKW, WPM, 1/2(DKW+WPM)	-	Mikropropagacija i indukcija adventivnih izdanaka	Roschke i Pijut (2006.)

***J. regia* L.**	Difco Bacto agar	0.7 %	MS, K(h)	5.8	Morfološka istraživanja i kultura embrija	Fernandez i sur., (2000.)
***J. regia* L. klon RG1**	Roland agar	7.5 g/l	DKW	-	Proliferacija aksilarnih pupova	Heloir i sur., (1996.)
***J. regia* L. podloga cv. Perlata**	Difco Bacto agar	7 g/l	WPM, DKW, NGE	5.7.	Germinacija i proliferacija embrija	Sanchez-Zamora i sur., (2006.)

Uporabom phytagela znatno je bolja produkcija kalusa, dužina izdanaka i broj listova na izbojcima nego kod Difco Bacto agar (Saadat i Hennerty, 2002.) što potvrđuje rezultate Barbas i sur., (1993b.), Cornu i Jay-Allemand (1989.), Nairn i sur., (1995.), Pasqualetto i sur., (1988.). Barbas i sur., (1993.) iznose velike razlike u mineralnom sadržaju ovih učvršćivača. Gelrite je sadržavao veću količinu Ca, Mg, K i Fe u odnosu na Difco Bacto agar, dok ih je agar sadržavao trostruko više nego gelrit. Tekući hranjivi medij bez ikakvog učvršćivača može dati bolji kontakt između eksplantata i medija što povećava dostupnost citokinina i drugih hranjivih tvari uz razrjeđivanje svih štetnih eksudata iz eksplantata (Payghamzadeh i Kazemitabar, 2008b.). Uspostavljanje tekuće kulture (Slika 8.) daje i nekoliko drugih prednosti te je važan korak u automatizaciji samog procesa mikropropagacije. Eliminacija agara u tekućem mediju posljedično smanjuje troškove nabavke istog.

Slika 8. Tekuća kultura / bioreaktori - TIB sustav, FAZOS (Foto: Bošnjak, 2020.)

3.3. Okolišni čimbenici *in vitro* kulture oraha

3.3.1. Svijetlost

Tablica 6. iznosi okolišne parametre *in vitro* uvjeta kod oraha. Pregledom literature zaključujemo da intenzitet svjetlosti igra važnu ulogu tijekom rasta izdanaka. Intenzitet svjetla od 1000 do 3000 lux-a (cca. 40 – 92 μmol/m^{-2}/s^{-1}) dovoljan je za kulturu embrija, kulturu aksilarnih pupoljaka i proliferaciju izdanaka oraha (Jay-Allemand i sur., 1992.; Kaur i sur., 2000.; Longi sur., 1995.; Roschke i Pijut, 2006.; Paygamzedeh, 2008.). Capellades i sur., (1990.) smatraju da *in vitro* presadnice nalikuju biljkama uzgajanim u staklenicima te je stoga i veća potreba za svjetlom (80 μmol/m^{-2}/s^{-1}), a obično je dostupno svega 25 μmol/m^{-2}/s^{-1} zbog raznih izvedbi *in vitro* posuda (disperzija svjetla). Fotoperiodizam od 16 do 18 h pomoću Sylvania Grolux bijele fluorescentne žarulje ili hladne bijele fluorescentne žarulje pojedini istraživači najčešće navode u svojim istraživanjima (Sanchez-Zamora i sur., 2006.; Heloir i sur., 1996.; Skatsoyiannes i sur., 1997.; Long i sur., 1995.; Roschke i Pijut, 2006.; Payghamzadeh i Kazemitabar, 2008abcd.). Zaključujemo da u *in vitro* kulturi tkiva oraha fotoperiodizam 16 do 18 h osvjetljenja rezultira normalnom stopom rasta, multiplikacijom i germinacijom.

3.3.2. Temperatura

Za somatsku embriogenezu, kulturu embrija, proliferaciju, stvaranje izdanaka ili korijena najidealnija temperatura je u rasponu od 22 do 28 °C (Tablica 6.). Kaur i sur., (2006.) koristili su temperaturu od 22 °C za kulturu embrija, San i Hatic (2006.) temperaturu od 25 °C za somatsku embriogenezu te Fernandez i sur., (2000.) temperaturu od 26 °C za morfološka istraživanja na kulturi embrija. Long i sur., (1995.) navode temperaturu od 25 °C u somatskoj embriogenezi na *J. Nigra* L.

Tablica 6. Okolišni (fizikalni) parametri potrebni za *in vitro* kulturu oraha, (Izvor: Payghamzadeh i Kazemitabar, 2011.).

Vrsta/ kultivar	Intenzitet svjetla	Izvor svjetla	Fotoperiodizam	Temperatura	Medij	Metoda	Referenca
***J. cinerea* L.**	92 µmol/ m^{-2}/s	Hladno bijela fluorescentna lampa	18 h	26 °C	MS	Kultura aksilarnih pupoljaka	Pijut (1997.)
***J. regia* L.**	55 - 65 µEm^{-2}/s	Hladno bijela fluorescentna lampa	16 h	27±1 °C	DKW	Kultura embrija i multiplikacija izdanaka	Jay-Allemand i sur., (1992.)
***J. cinerea* L.**	92 µmol/m^{-2}/s^{-1}	Hladno bijela fluorescentna lampa	18 h	26 °C	1/ 2 MS	Rizogeneza mikroizdanaka	Pijut (1997.)
***J. cinerea* L.**	-	-	-	26 °C	DKW ili MS	Somatska embriogeneza	Pijut (1993a.)
***J. regia* L.**	-	-	-	25 °C	DKW	Somatska embriogeneza	San i Hatic (2006.)
***J. regia* L.**	3000 Lux	-	16/8 h	22 °C	MS	Kultura embrija	Kaur i sur., (2006.)
***J. regia* L.**	80 µmol/m^{-2}/s^{-1}	-	16 h	24±2 °C	MS,DKW, WPM, 1/2(WPM+DKW)	Indukcija adventivnih izdanaka	Roscke i Pijut (2006.)
***J. regia* L.**	40 µmol/m^{-2}/s^{-1}	Hladno bijela fluorescentna lampa	16 h	25 °C	1/2 K(h), MS	Morfološko istraživanje i kultura embrija	Fernandez i sur., (2000.)

***J. regia* L. cv. Plemania1, Plemania2**	55 - 65 $\mu Em^{-2}/s$	Hladno bijela fluorescentna lampa	6 h prvih 6 dana, preostalih dana 8 h	24±1 °C prvih 6 dana, preostale dane 21±1 °C	DKW (1/4 makrosoli)	Rizogeneza	Scaltsoyiannes i sur., (1997.)
***J. regia* L. klon RG1**	312 $mol/m^{-2}/s^{-1}$	Sylvania Grolux fluorescentna lampa	16 h	Dan/noć 28/25 °C	DKW	Proliferacija izdanaka	Heloir i sur., (1996.)
***J. regia* L. cv.Plemania1, Plemania2**	55 - 65 $\mu Em^{-2}/s$	Hladno bijela fluorescentna lampa	16 h	27±1 °C	DKW	Somatska embriogeneza i multiplikacija izdanka	Scaltsoyiannes i sur., (1997.)
***J. regia* L. podloga cv. Perlata**	5000 Lux	Philips TLD 58w/54	16 h	25±1 °C	DKW, WPM, NGE	Germinacija i proliferacija embrija	Sanchez-Zamora i sur., (2006.)
***J. regia* L.**	-	-	-	25 °C	DKW	Germinacija somatskih embrija	Deng i Cornu (1992.)

3.4. Rizogeneza mikroizdanaka

Veliki je trud znanstvenika uložen u poboljšanju učinkovitosti rizogeneze mnogih kultivara oraha. Rizogeneza mikroizdanaka može se postići u *in vitro* i *ex vitro* uvjetima.

3.4.1. In vitro rizogeneza mikroizdanaka

In vitro rizogeneza ovisi o interakciji unutarnjih i vanjskih čimbenika (Hyndman i sur., 1982a.; Scaltsoyiannes i sur., 1997.). Poznato je da genotip ima važnu ulogu u svim fazama vegetativnog razmnožavanja. Isti autori primjećuju na hibridu *J. nigra* × *J. regia* da je predtretman s 24.6 μM IBA u mraku (5 dana) neophodan za indukciji rizogeneze. Scaltsoyiannes i sur., (1997.) utvrdili su da je 6-dnevni predtretman s istom koncentracijom IBA poboljšao rizogenezu. Pokazalo se da razina endogenih hormona i aktivnost peroksidaze ima koristan učinak u indukciji rizogeneze (Gaspar i sur., 1992 i 1994.). Leslie i McGranahan (1992.) iznose najveću frekvenciju rizogeneze (75 %) na polučvrstom MS mediju koji je sadržavao 2.5 μM IBA te proveo 7 dana u mraku. Adventivni korjenčići počeli su se pojavljivati unutar 7 dana te po transferu na svjetlo došlo je do elongacije istih.

3.4.2. Anorganske soli u rizogenezi

Već je poznato da se uporabom relativno niske koncentracije soli poboljšava rizogeneza izdanaka (Murashige, 1979.). Pijut (1997.) koristio je 1/2 MS koncentracije soli u mediju namijenjenom rizogenezi izdanaka. Scaltsoyiannes i sur., (1997.) u rizogenezi izdanaka koriste DKW medij s 1/4 koncentracije makroelemenata. Povećanjem omjer NO_3/NH_4 od 0.1 do 3.0 dovodi do povećanja broja korjenčića po eksplantatu. Hyndman i sur., (1982a.) ukazuju da smanjenje koncentracije KNO_3 i NH_4NO_3 predstavlja odlučujući čimbenik u poboljšanju uspješnosti rizogeneze. Long i sur., (1995.) iznose da je za rizogenezu izdanaka potreban 1 tjedan na DKW mediju uz smanjenu količinom dušika (456.2 mg/l NH_4NO_3 i 634.0 mg/l $Ca(NO_3)_2$) s visokom koncentracijom šećera (Driver i Suttle, 1987.).

3.4.3. Ugljikohidrati i struktura medija u rizogenezi

Saharoza djeluje kao pojačivač osmotskog potencijala te igra ključnu ulogu u indukciji korijena. Rout i sur., (1990.) iznose da je rizogeneza mikroizdanaka bila bolja na krutom

mediju u usporedbi s tekućim medijem. Damiano i sur., (1989.) uočili su poboljšanje *in vitro* rizogeneze pomoću dvofaznog medija, tj. agarizirani donji dio medija s gornjim slojem tekućeg medija. Ebrahim i Ibrahim (2000.) iznose da je duljina korijena na krutom mediju bila manja u usporedbi s tekućim medijem. Scaltsoyiannes i sur., (1997.) iznose 95 %-tnu rizogenezu na nekoliko kultivara oraha iniciranih na DKW medij bez biljnih regulatora rasta uz dodatak saharoze od 40 g/l. Long i sur., (1995.) u rizogenezi izdanaka koristili su visoku koncentraciju saharoze (52.64 g/l). Međutim, više od 3 % saharoze dovodi do pojave posmeđenja korijena. Neka istraživanja govore i o uporabi sorbitola.

3.4.4. Aktivni ugljen u rizogenezi

Dodavanje aktivnog ugljena u medij učinkovito je u mikropropagaciji oraha, odnosno bolja je rizogeneza u smislu produkcije broja korjenčića bez utjecaja na njegovu dužinu. Nadalje, dodavanje aktivnog ugljena smanjuje broj potrebnih dana za inicijaciju korjenčića. Revilla i sur., (1989.) iznose učinkovitu rizogenezu nakon uranjanja baze izdanaka u tekući medij s 2 mg/1 IBA kroz 24 sata, a zatim se prenose na polučvrsti mediji koji sadrži 1% aktivnog ugljena. Aktivni ugljen utječe i na sorpciju polifenola eksudiranog s površine eksplantata. Payghamzadeh i Kazemitabar (2008b.) iznose smanjenje štetnog učinka eksudiranih polifenolnih spojeva upotrebom dvofaznog medija kod kojeg je niža faza bila oplemenjena aktivnim ugljenom bez biljnog regulatora rasta, dok je gornja faza bila tekući bazalni medij dopunjen različitim koncentracijama BAP-a.

3.4.5. Biljni regulatori rasta u rizogenezi

Upotrebljavaju se različiti rasponi koncentracija auksina u indukciji rizogeneze (Tablica 4.). Postupak rizogeneze odvija se u dvije faze:

I. faza indukcije: mikroizdanci (4 - 5 cm) se kultiviraju na DKW medij s 1/4 koncentracije makroelemenata te 24.6 µM IBA i 40 g/l saharoze (Jay-Allemand i sur., 1992.) a potom čuvaju u tami 6 dana na temperaturi od 24±1 °C tijekom 16 h i 21±1 °C tijekom naredih 8 h.

II. faza inicijacije: prethodno kultivirani izdanci prenose su na sterilni vermikulit s polučvrstim DKW medijem koncentracije 1/4 makroelemenata i bez hormona.

Scaltsoyiannes i sur., (1997.) prenosili su mikroizdanke (4 do 5 cm) klonova P3 i P7 nakon prve faze indukcije na medij koji je sadržavao dvije različite frakcije vermikulita (srednji tip I mali tip II). Svaki tretman sadržavao je 20 mikroizdanaka. Srednji tip I rezultirao je bojim učinkom, postotkom i kvalitetom korijenovog sustava. Pozitivan učinak vermikulita srednje veličine i prozračnost u fazi rizogenezi apostrofiraju i Jay-Allemand i sur., (1992).

3.4.6. Usporedba in vitro i ex vitro rizogeneze

McGranahan i sur. (2006) uspoređivali su *in vitro* i *ex vitro* rizogenezu te opazili veliku varijabilnost među genotipovima oraha. Preživljavanje eksplantata *ex vitro* tehnikom u staklenicima s misterima poboljšano je na 80 % u usporedbi s *in vitro* metodom (50 %). *Ex vitro* biljke rasle su brže i bolje se pripremile za dormancu. Sama metoda propagacije, rizogeneze, aklimatizacije i rasta *ex vitro* opisana je u istraživanju Walnut Research Reports iz 2001 godine. Pijut (1997.) iznosi uspješnost od 75 % na *J. cinerea* L. Carpenter (1975.) 60 – 70 % na crnom orahu. Gautam i Chauham (1990.) opisuju rizogenezu izdanaka skinutih s 4 - 5 godina stare krošnje *J. regia* L. koji su bili tretirani s (14.5 %) 74 mM IBA.

3.5. Aklimatizacija i prilagodba na supstrat

Uspješna aklimatizacija *in vitro* biljaka i njihov naknadni prijenos na polje ključan je korak u *in vitro* tehnici. Postupak aklimatizacije oraha vrlo je težak zbog brzog propadanja (sušenja) presadnica i njihove osjetljivosti na bolesti uslijed visokog sadržaja vlage tijekom faze rizogeneze. Preece i Sutter (1991.) i Sutter i sur., (1992.) promatrali su *in vitro* presadnice u stakleniku i presadnice na otvorenom polju koje su bile pričvršćene za celulozni nosač (sorbarod sistem). Nosač im je pružao potporu i zaštitu korijena tijekom prijenosa u tlo te osigurao bolju prozračnost i dostupnost vlage. Bolji postotak preživljavanja zabilježen je na biljkama koje su bile prenesene u *ex vitro* uvjete. Sorbarod sustav osigurao je potrebnu zaštitu i pomogao u indukciji većeg korijena (100 % uspješna prilagodba na polju). Detaljna aklimatizacija i rast *in vitro* biljaka u stakleniku opisana je u Walnut Research Reports (2001).

4. ZAKLJUČAK

U protekla tri desetljeća *in vitro* propagacija oraha izazvala je revoluciju u komercijalnim rasadnicima. *Juglans* vrste se obično razmnožavaju sjemenom, a dormantnost embrija glavno je ograničenje u širenju i razvoju kultivara putem hibridizacije. Najpopularniji način razmnožavanja oraha je cijepljenje koje zahtjeva intenzivan rad, dugotrajno je i skupo. Vegetativno razmnožavanje reznicama vrlo je teško zbog niske sposobnosti rizogeneze.

Mikropropagacijom u odnosu na konvencionalne metode vegetativnog razmnožavanja stvaramo veliki broj genetski identičnih biljaka u kratkom vremenskom razdoblju neovisno o sezonskoj dinamici.

Izbor eksplantata za inicijaciju *in vitro* kulture diktira daljnju metodu (tehniku) *in vitro* razmnožavanja. Juvenilni eksplantati oraha pogodni su za indukciju somatske embriogeneze, kalusa, korijena, germinaciju i organogenezu izdanaka.

Najčešći problem predstavlja posmeđenje hranjivog medija kao rezultat oksidacije polifenola izlučenih iz rezne površine na eksplantatu, a može se prevladati dodavanjem tvari kao što su polivinil pirolidon (PVP), limunska kiselina, askorbinska kiselina, aktivni ugljen, tiourea, L-cistein, glutamin, asparagin, arginin, učestala subkultivacija i tamna faza.

Jedan od najvažnijih čimbenika *in vitro* kulture je uspostavljanje i održavanje aseptičnih uvjeta, a u sterilizaciji se najčešće koriste različite koncentracije NaOCl.

Značajan je i utjecaj genotipa u *in vitro* razmnožavanju oraha, odnosno pojedini kultivari imaju drugačije zahtjeve prema regulatorima rasta.

U mikropropagaciji oraha koriste su različiti hranjivi mediji. Iako je DKW medij razvijen za podlogu oraha Paradox, pokazao se prikladnim i za razne druge *Juglans* vrste te predstavlja najčešće korišteni medij u kulturi tkiva oraha. Orahu je za multiplikaciju potrebno puno soli u mediju s toga je upravo DKW medij vrlo prikladan (velika koncentracija makrosoli).

Izvor ugljikohidrata u mediju najčešće je saharoza (šećer). Mnogi istraživači drže se preporučene koncentracije od 3 %.

Uključivanje BAP-a i gibrelinske kiseline (GA3) u medij ključno je u proliferaciji pupova i germinaciji embrija oraha. BAP i IBA imaju pozitivan utjecaj na klijanje embrija i razvoj kalusa.

Kao zgušnjivač najčešće se upotrebljava Agar iako se Phytagel i Gelrite nameću kao alternativa u učvršćivanju DKW medija.

Intenzitet svjetlosti igra važnu ulogu tijekom rasta *in vitro* izdanaka. Intenzitet svjetla od 1000 do 3000 lux-a (cca. 40 – 92 μmol/m^{-2}/s^{-1}) dovoljan je za kulturu embrija, kulturu aksilarnih pupoljka i proliferaciju izdanaka oraha.

Za somatsku embriogenezu, kulturu embrija, proliferaciju, stvaranje izdanaka ili korijena najidealnija temperatura je u rasponu od 22 do 28 °C.

Rizogeneza mikroizdanaka može se postići u *in vitro* i *ex vitro* uvjetima. Predtretman s određenom koncentracijom IBA-e s tamnom fazom neophodan je za indukciju rizogeneze. Smanjenje koncentracije soli, povećanje sadržaja saharoze, dodavanje aktivnog ugljena i vermikulita u mediju te izbacivanje hormona predstavljaju odlučujuće čimbenike u poboljšanju uspješnosti rizogeneze.

Postupak aklimatizacije oraha vrlo je težak zbog brzog propadanja (sušenja) presadnica i njihove osjetljivosti na bolesti uslijed visokog sadržaja vlage tijekom faze rizogeneze. Sorbarod sustav osigurava potrebnu zaštitu i pomaže u prilagodbi na *ex vitro*.

Uspostavljanje tekuće kulture (TIS/ TIB sustavi) daje nekoliko drugih prednosti te je važan korak u automatizaciji samog procesa mikropropagacije oraha.

5. POPIS LITERATURE

1. Aly, M.A.M., Fjellstrom, R.G., McGranahan, G.H., Parfitt, D.E. (1992): Origin of walnut somatic embryos determined by RFLP and isozyme analysis. HortScience, 27(1):61-63. Bailey LH, Bailey EZ (1976). Hortus third. (eds). Macmillan, New York, p. 1290.

2. Barbas, E., Chaillou, S., Cornu, D., Doumas, P., Jay-Allemand, C., Lamaze, T. (1993a): Orthophosphate nutrition of *in vitro* propagated hybrid walnut (*Juglans nigra* x *Juglans regia*) trees: Pi (32Pi) uptake and transport in relation to callus and shoot.

3. Barbas, E., Jay-Allemand, C., Doumas, P., Chaillou, S., Cornu, D. (1993b): Effects of gelling agents on growth, mineral composition and naphthoquinone content of *in vitro* explants of hybrid walnut tree *Juglans regia-Juglans nigra* L. Ann. Sci. For. (Paris), 50:177-186.

4. Barbas, E., Chaillou, S., Cornu, D., Doumas, P., Jay-Allemand, C., Lamaze, T. (1993): Ortho-phosphate nutrition of *in vitro* propagated hybrid walnut (*Juglans nigra* X *Juglans regi*a) trees: (Pi) uptake and transport in relation to callus and shoot development. Plant Physiol. Biochem. 31(1):41-49.

5. Boltivets, V.S., Piven, N.M. (1990): Induced embryogenesis in the tissue culture of walnut. Fiziologiyai Biokhmiya Kul Turnykh Rastanii 22(4):409-413. Bridgen MP (1994). A review of plant embryo culture. Hortic. Sci. 29:1243-1246.

6. Capellades, M., Fontarnau, R., Carulla, C., Debergh, P. (1990): Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue cultured Rosa multiflora. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 115:141-145.

7. Carpenter, S.B. (1975): Rooting black walnut cuttings with ethephon. Tree Planters' Notes, 26(3):29.

8. Chalupa, V. (1981): Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro.* Commun. Inst. For. Cech. 12:255-271.

9. Chelawant, D., Jay-Allemand, C., Gendraud, M., Frossard, J.S. (1995): The effect of Sucrose on the development of hybrid walnut microcuttigns (*Juglans regia* × *Juglans*

nigra). Consequences on their survival during acclimatization. Ann. Des Sci. For. 52(2):147-156.

10. Chenevard, D., Frossard, J.S., Jay-Allemand, C. (1997): Carbohydrate reserves and CO2 balance of Hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23X *Juglans regia*) Plantlets during acclimatisation. Sci. Hortic. 68:207- 217.

11. Cheng, T.Y. (1975): Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (Pseudotsuga menziensii Mirb, Franco). Plant Sci. Lett. 5:97-102.

12. Christianson, M.L., Warnick, D.A. (1987): In: Hanover JW, Keathley DE (eds) Genetic manipulation of woody plants. Plenum Press, New York, pp. 101-115.

13. Claudet, A.C., Drauet, A., Jay-Allemand, C. (1992): Tissue distribution of phenolic compounds in annual shoots from adult and rejuvenated hybrid walnut trees. Plant Physiol. Biochem. 30(5):565-572.

14. Cornu, D. (1988): Somatic Embryogenesis in Tissue Cultures of Walnut (*Juglans nigra*, *J. major*, and hybrids *J. nigra* × *J. regia*), In: Somatic Cell Genetics of Woody Plants, Ed: Ahuja MR, Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands, pp. 45-49.

15. Cornu, D., Jay-Allemand, C. (1989): Micropropagation of hybrid walnut trees (*Juglans nigra* × *Juglans regia*) through culture and multiplication of embryos. Ann. Sci. For. 46:113-116.

16. Cossio, F., Minotta, G. (1983): Prove preliminary di coltura *in vitro* di embrioni isolati di noce (*Juglans regia*L.) e confronto tra differenti di sali minerali, *Riv. Ortoflorofrutt. It.* 67:287-298.

17. Curir, P., Damiano, C., Cosmi, T. (1986): *In vitro* propagation of some rose cultivars. Acta. Hortic. 189: 21-224.

18. Damiano, C., Curir, D., Esposito, P., Ruffoni, B. (1989): Present micropropagation research programs at ISF in Sanremo. Acta Hortic. 251:129-133.

19. Deng, M.D., Cornu, D. (1992): Maturation and germination of walnut somatic embryos. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 28:195-202.

20. Driver, J.A., Suttle, G.R.L. (1987): In: Bonga JM, Durzan DH (eds) Cell and tissue culture in forestry, Martinus Nijhoff, Boston, 2:320-335.

21. Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984): *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. HortScience, 19:507-509.

22. Dumanoglu, H. (2000): Dessiccation using saturated salt solutions and improvement germination rate of walnut (*Juglans regia* L.) somatic embryos. Turk. J. Agric. For. 24:491-498.

23. Ebrahim, M.K.H., Ibrahim, A.I. (2000): Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of Maranta leuconeura cv Kerchoviana. Sci. Hortic. 86:211-221.

24. Elias, T.S. (1980): The complete treese of North America.-New York: Van Nostrand Reinhold.

25. Eriksson, T. (1965): Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopapus gracilis*. *sinensis* Dode from bud culture. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea, 22:159-163.

26. Leslie, C., McGranahan, G. (1992): Micropropagation of Persian walnut (*Juglans regia* L.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 18. High-tech and micropropagation I 1. Springer, BerlinHeidelberg New York, pp. 136-150.

27. Liu, S.L., Han, B.W. (1989): Plant regeneration from excised embryos of *Juglans regia*. Acta Phytophysiol. Sinica, 15:98-100.

28. Lloyd, G., McCown, B. (1981): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. Proc. Plant Prop. Soc. 30:421-427.

29. Long, L.M., Preece, J.E., Van Sambeek, J.W. (1995): Adventitious regeneration of *Juglans nigra* L. (eastern black walnut). Plant Cell Rep. 14:799-803.

30. Long, L.M., Preece, J.H., Gaffney, G.R., Van Sambeek, J.W. (1992): Somatic embryogenesis and organogenesis of eastern black walnut (*J. nigra*), Hort. Sci. 27(6):p.584.

31. Manning, W.E. (1978): The classification within the *Juglandac*eae - Ann. Missouri Bot. Gard. 65:1058-1087.

32. McDaniel, J.C. (1979): Other walnut including butternut, heartnut, and hybrids.- In: Jaynes RA (Ed.). Nut tree culture in North America,.-Hamdem, CT: North. Nut Growers Assoc. pp.98-110.

33. McGranahan, G.H., Driver, A., Tulecke, W. (1987): Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga GM, Durzan DJ (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry, Martinus Nijhoff, Dordrecht, 3:261-271.

34. McGranahan, G., Leslie, C. (1990): Walnuts (*Juglans*). In: Moore JN, Ballington JR (eds). Geneticresources of temperate fruit and nut crops, Int. Soc. Hortic. Sci. Wageningen, 2:907-951.

35. McGranahan, G., Leslie, C.A. (1987): *In vitro* propagation of mature Persian walnut cultivars. Hort. Sci. 23(1):220.

36. McGranahan, G., Leslie, C.A., Driver, J.A. (1988): In vitro propagation of mature Persian walnut cultivars. Hort. Sci. 23(1):220

37. Meynier, V. (1985): Miseen culture *in vitro* de meristmes de noyers hybrides. C R Acad.Sci. Paris Ser. 301(5):261-264.

38. Meynier, V., Arnould, M.F. (1989): Compared effectiveness of antibiotic treatments and shoot tip culture on bacterial decontamination of an *in vitro*-propagated clone of hybrid walnut (*Juglans nigra* × *J. regia*). Biol. Plant, 31(4):269-275.

39. Murashige, T. (1979): Principles of rapid propagation. In: Hughes KW, Hanks R, Constantin M, editors. Propagation of higher plants through tissue culture A bridge between research and application National Tech In to Serv, US Dept of commerce Spring field. p.14-24.

40. Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

41. Nairn, B.J., Furneaux, R.H., Stevenson, T.T. (1995): Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. Plant Cell Tisse. Organ. Culture. 43:1-11.

42. Neuman, M.C., Preece, J.E., Van Sambeek, J.W., Gaffney, G.R. (1993): Somatic embryogenesis and callus production from cotyledon explants of Eastern black walnut. Plant Cell Tissue Organ Culture, 32:9-18.

43. Orchard, L.P. (1984): Butternut canker: host range, disease resistance, seedling-disease reactions, and seed-borne transmission. PhD Diss, Un iversity of Wisconsin, Madison p.145.

44. Ostry, M.E., Pijut, P.M. (2000): Butternut: an underused resource in North America. Hort. Technol. 10(2):302-306.

45. Pasqualetto, P.L., Zimmerman, R.H., Fordham, I. (1988): The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ. Culture, 14:31-40.

46. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. (2008a): Comparison effects of MT novel medium with modified DKW basal medium on walnut micropropagation. Proceeding book of the 1st national conference of student biology and modern world, p.204.

47. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. (2008b): An investigation on asexual propagation of adult Persion walnut (*Juglans regia* L.) via single nod culture and apical shoot culture Abstract book of the 15th national and 3 th international conference of biology. p.208.

48. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. (2008c): Assessment on effects of physical factors and interaction its with GA3 on walnut local cultivar micropropagation. Abstract book of the 10th Iranian genetic congress.

49. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. (2008d): Somatic embryogenesis from immature cotyledons of a local cultivar of walnut. Proceeding book of the 1st national conference of student biology and modern world, p.25.

50. Payghamzadeh, K. (2008): Somatic embryogenesis from immature cotyledons and meristemic culture of walnut (Juglans regia L.). The MSc thesis. College of agriculture, Dep of Plant breeding and Biotechnology, University of Agricultural and Natural Resources of Sari, Iran. pp.48-77.

51. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. (2010a): The effects of BAP and IBA and genotypes on in vitro germination of immature walnut embryos. Inter. J. Plant Produc. 4(4):309-322.

52. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. (2010b): In vitro germination of Pecan (Carya illinoinensis) embryo. Biharean Biol. 4 (1) :37-43. Penuela R, Garavito C, Sanchez-Tames R, Rodrıguez R (1988). Mutiple shoot-bud stimulation and rhizogenesis induction of embryogenic and juvenile explants of walnut. Acta Hort. 227:457-459.

53. Payghamzadeh, K., Kazemitabar, S.K. (2011): In vitro propagation of walnut - A reviw. African Journal of Biotechnology Vol.10(3), pp.290-311

54. Peterson, T.A. (1990): Wisconsin forest products price review, timbered. USDA Coop Ext Serv, University of Wisconsin, Madison, p.5.

55. Pierik, R.L.M. (1987): In vitro propagation of higher plants. Boston7 Martinus, Nijhoff Publishers. In: Pati, P. K., S. P. Rath. M. Sharma., A. Sood., P. S. Ahuja. 2006. In vitro propagation of rose-a review. Biotechnol. Adv. 24(1):94-114.

56. Pijut, P.M. (1993): Somatic embryogenesis in butternut, Juglans cinerea. Can. J. For.Res. 23:835-838.

57. Pijut, P.M. (1993a): Somatic embryogenesis in butternut, Juglans cinerea. Can. J. For. Res. 23:835-838.

58. Pijut, P.M. (1993b): Regeneration of Juglans cinrea through somatic embryogenesis. Part II, In Vitro Cell. Dev. Biol. 29(3):69.

59. Pijut, P.M. (2004): Vegetative propagation of butternut (Juglans cinerea) field results In: Michler, C.H.; Pijut, P. M. Van Sambeek, J.W.; Coggeshall, M.V.; Seifert, J.; Woeste, K.; Overton, R.; Ponder, F., Jr., eds. Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium; Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station. pp.37- 44.

60. Pijut, P.M. (1997): Micropropagation of Juglans cinerea L. (Butternut). High-Tech and Micropropagation V. Ed. Y.P.S. Bajaj. SpringerVerlag, Berlin, Biotechnol. Agric. For. 39:345-357.

61. Pittet, H., Moncousin, C. (1981): Multiplication novelle du rosier. Rev. Horticult. Suisse, 54: 169-173. Polito VS, McGranahan G, Pinney K, Leslie C (1989). Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (Juglansregia L.): implications for Agrobacterium-mediated transfor mation. Plant Cell Rep. 8:219-221.

62. Preece, J.E., Compton, M.E. (1991): In: Bajaj YPS (ed) High-Tech and Micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin Biotechnology in agriculture and forestry, 17:168-189.

63. Preece, J.E., Sutter, E.G. (1991): Acclimatization of micropropagated plants to the green house and field. In: Debergh PC, Zimmerman RH, editors. Micropropagation. The Netherlands7 Kluwer. pp.71-93.

64. Preece, J.E., Van Sambeek, J.W., Huetteman, C.A., Gaffney, G.R. (1989): In vitro studies with walnut (Juglans) species. In: Phelps JE (ed) The Continuing Quest for Quality, Proceed 4th Black Walnut Symp. Carbondale, Illinois. pp.159-180.

65. Raghavan, V. (1977): Applied aspects of embryo culture. In: Reinert J and Bajaj YPS (eds) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue Culture, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag. pp.375-397.

66. Raghavan, V. (1980): Embryo culture. In: Vasil IK (ed) International review of cytology supplement 11B. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture, New York: Academic Press. pp.209-240.

67. Ramming, D.W. (1990): The use of embryo cultura in fruti breeding, HortScience, 25:393-398.

68. Renukdas, N.N., Manoharan, M., Garner, J.O. (2010): In vitro propagation of pecan [Carya illinoinensis (Wangenh) K. Koch]. Plant Biotechnol. 27:211–215.

69. Renukdas, N.N., Manoharan, M., Garner, J.O. (2008): In vitro plant regeneration of pecan [Carya illinoinensis (Wangenh) K. Koch]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 44:342-363.

70. Renukdas, N.N., Manoharan, M., Garner, J.O. (2009): In vitro propagation of pecan (Carya illinoinensis (Wangenh) K. Koch. ARD 15th Biennial Research Symposium, Atlanta, Georgia (P181).

71. Revilla, M.A., Majada, J., Rodriguez, R. (1989): Walnut (Juglans regia L.) micropropagation. For. Tree Physiol. 46:49-151.

72. Rietvel, W.J. (1982): The significance of allelopathy in blackwalnut cultural systems. Northern Nut Growers Association. Annu. Rep. 72:117-134.

73. Rietvel, W.J. (1983): Allelopathic effects of juglone on germinationand growth of several herbaceous and woody species. J. Chem. Ecol. 9 295-308.

74. Robacker, C. (1993): Somatic embry ogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants, HortScience, 28(1):53-55.

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

76. Rodriguez, R., Lopez, C., Diaz-Sala, C., Berros, B. (1993): Simultaneous shoot-bud development on walnut tissues of different ages: macromorphological and histologica analyses. Acta Hort. 311:141- 152.

77. Rodriguez, R., Revilla, A., Albuerne, M., Perez, C. (1989): Walnut (Juglans spp). In: Bajaj YPS (ed) Trees II. Springer, Berlin Heidelberg New York. Biotechnol. Agric. For. 5:99-126

78. Roschke, C., Paula, M.P. (2006): Website., http://ncrs.fs.fed.us/4157/local resources/downloads/posters/2006/Roschke.pdf

79. Rout, G.R., Debata, B.K., Das, P. (1990): In vitro clonal multiplication oroses. Proc. Natl. Acad. Sci. India, 60:311-318.

80. Rout, G.R., Samantaray, S., Mottley, J., Das, P. (1999): Biotechnology of the rose: a review of recent progress. Sci. Horticult. 81:201-228.

81. Saadata, Y.A., Hennerty, M.J. (2002): Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Sci. Horticult. 95:251-260.

82. San, B., Hatice, D. (2006): Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Apomictic and Non-Apomictic Seeds in Walnut (*Juglans regia* L.). Turk. J. Agric. For. 30:111-117.

83. San, B., Hatic, D. (2007): Effect of Desiccation, cold storage, and gibberellic acid on germination of somatic embryos in walnut (Juglans regia). New Zealand Jurnal of Crop and Horticulture science 35 (1):73-78.

84. Sanchez-Zamora, M.A., Diego Frutos Tomas, J.C.T., Garcia-Lopez, R. (2006): Embryo germination and proliferation in vitro of *Juglans regia* L. Sci. Horticult. 108(3):317-321.

85. Scaltsoyiannes, A., Tsoulpha, P., Panetsos, K.P., Moulalis, D. (1997): Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*Juglans regia* L.), Sil. Gen. 46(6):326-332.

86. Sommers, P.W., Van Sambeek, J.W., Preece, J.E., Gaffney, G., Myers, O. (1982): *In vitro* micropropagation of black walnut. In: Proc 7th North Am For Biol, Lexington KY: Univ. Kentucky Press. pp.224-230.

87. Steger, M.M., Preece, L.E., Hammerschlag, F., Saxena, P. (2003): The influence of source tree on somatic embryogenesis from eastern black walnut (*Juglans nigra*) immature cotyledons. Acta Hortic. 625:249-252.

88. Stephans, L.C., Krell, S.L., Domoto, P.A. (1990): *In vitro* propagation of *Juglans regia.* sf. Hamden, Connecticut USA. Ann. Rep. Northern Nut Growers, 9:122-126

89. Sutter, E.G., Shackel, K., Diaz, J.C. (1992): Acclimatization of tissue cultured plants. Acta Hortic. 314:115-118.

90. Tantikanjana, T., Young, W.H.J., Letham, D.S., Griffith, M., Hussain, M., Ljung, K. (2001): Control of axillary bud proliferation and shoot architecture in Arabidopsis through supershoot gene 12:1587-1588.

91. Tetsumura, T., Tsukuda, K., Kawase, K. (2002): Micropropagation of shinano walnut (*Juglans regia* L.).J. Japan. Soc. Hort. Sci. 17:661- 666.

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

93. Tulecke, W., McGranahan, G.H., Leslie, C.A. (1995):. Somatic embryogenesis in walnut *(Juglans* species). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and

forestry, Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer, Berlin Heidelberg New York, 30:370-377.

94. Vahdati, K., Leslie, C., Zamani, Z., McGranahan, G. (2004): Rooting and acclimatization of *in-vitro* grown shoots from three mature Persian walnut cultivars. Hort. Science 39:324-327.

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

96. Voyiatzis, D.G., McGranahan, G.H. (1994): An improved method for acclimatizing tissue-cultured walnut plantlets using an antitranspirant. Hort. Sci. 29(1):4-2.

97. Yalçın, I. (1993a): *Juglans regia* L. sürgün çeliklerinin kök olusturmasında anatomik engeller ve kök olusumu üzerine bir arastırma. C.Ü. Fen Bil. Der. 15(16):63-80.

98. Williams, R.D. (1990): *Juglans nigra* L., Black walnut. In: Burns RM, Honkala BH (techcoords) Silvics of North America, Hardwoods. USDA For Serv Agric Handbook 654, Washington, 2:391-399.

99. Witte, C.P., Tiller, S.A., Taylor, M.A., Davies, H.V. (2002): Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. Plant Cell Tissue Organ Culture, 68: 103-104.

100. Xi, R., Ding, P. (1990): Theory and practice of walnut grafting. Acta Hortic. 284:69-88.