Archive of SID

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره نوزدهم، شماره یک، بهار ۹۶

تلاشی در جهت ریزازدیادی گونه نمدار در شرایط درون شیشه‌ای

کمال قاسمی بزدی [1*]
kamalghasemi@gmail.com
وحیده پیام نور [2]
مصطفی مهرداد [3]
اکرم احمدی [4]

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۶ تاریخ پذیرش:۹۴/۸/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: نمدار از جمله گونه‌های مورد تهدید در شمال ایران است که درصد بسیار ناچیزی از جنگل‌های شمال کشور را تشکیل می‌دهد. از آن‌جایی‌که بذور نمدار در جوانه‌زنی با مشکلاتی هم‌چون خواب دوگانه فیزیولوژیکی (جنین) و مکانیکی (پوشش سخت پریکارپ) روبه‌رو هستند، استفاده از روش‌های کاربردی نظیر کشت بافت می‌تواند در کشت، بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی موثر واقع شود.

روش بررسی: این پژوهش با هدف تعیین مناسب‌ترین ریزنمونه و بهترین ترکیب هورمونی محیط کشت به منظور بهینه‌سازی ریزازدیادی گونه نمدار در شرایط درون شیشه‌ای انجام گرفت. ریزنمونه‌ها به صورت تصادفی از بهترین پایه‌های نمدار در جنگل توسکاستان گرگان جمع‌آوری و کشت گردیدند.

یافته‌ها: داده‌های به دست آمده با طرح کاملا تصادفی به وسیله نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصل از این بررسی، از بین یازده ریزنمونه مورد آزمایش، ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار به عنوان مناسب‌ترین ریزنمونه و IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان مناسب‌ترین ترکیب هورمونی محیط کشت در ساقه‌زایی در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه‌گیری: امید می‌رود نتایج حاصله بتواند در تحقیقات کشت بافت و تکثیر و هم‌چنین در مطالعات پایه مولکولی در این گونه مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: نمدار، محیط کشت، ریز نمونه، ساقه‌زایی، هورمون.

۱- دانشیار سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه‌ی تحقیقات پنبه‌ی کشور، گرگان. ایران *(مسوول مکاتبات)
۲- دانشیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ایران.
۳- دانش آموخته جنگل شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ایران.
۴- دکتری علوم جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گنبد، گنبد کاوس. ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

J.Env. Sci. Tech., Vol 19, No.1, spring, 2017

Attempt in order to Micropropagation of Linden *In vitro*

Kamal Ghasemi Bezdi[1]*
kamalghasemi@gmail.com
Vahideh Payamnour [2]
Mostafa Mehrdad[3]
Akram Ahmadi[4]

Abstract

Background and: Linden is one of threatened species in north of Iran that form very small percentage of the northern forests. Since the linden seeds are facing with germination problems such as with dual physiological (the embryo) and mechanical (hard cover pericarp) dormancy that application such as tissue culture can be effective in planting, restoration and conservation of genetic resources.

Method: This study was carried out in order to determine the most suitable explants and the best hormone combination to optimize micropropagation of linden in vitro. Explants were collected and cultured randomly from the best individual of linden from Gorgan Touskaestan forest.

Findings: In light of results, from the eleven tested explants, stem containing terminal buds with scale were selected as the most suitable explants and IBA 0.1 mg/l was selected as the most appropriate medium hormonal combination in shoot regeneration.

Discussion and Conclusion: Obtained data were analyzed with a completely randomized design by MSTATC software. It is hoped that the achieved results can be reproduced and be helpful in tissue culture research and also the molecular basis studies.

Keywords: Linden, Medium, Explant, Shoot regeneration, Hormone

1- Associate Professor, Department of Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Cotton Research Institute of Iran, Gorgan, Iran. *(Corresponding Author).
2- Associated professor, Faculty of forest sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- M.Sc., Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources Gorgan, Iran.
4-Ph.D, Department of Forestry, Faculty of Agriculture and Natural Resource, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در سال‌های اخیر، علاقه به استفاده از روش‌های کشت در تکثیر انبوه و حفاظت از ژرم پلاسم گونه های گیاهی در حال تهدید افزایش یافته است. کاهش تنوع و کاشت به‌دلیل جنگل زدایی و افزایش تقاضا منجر به استفاده از روش‌های درون شیشه ای تکثیر به عنوان یک نیاز اقتصادی شده است (۱). امروزه رشد سریع جمعیت، اهمیت به کارگیری علوم و فنون جدید را دو چندان کرده است. با علم به این موضوع که هر یک از سلول-های گیاهی تمایز نیافته توانایی تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند، دریچه‌ای تازه پیش روی دانشمندان و محققان علوم زیستی گشود و کشت درون شیشه‌ای نامیده شد. در مورد درختان جنگلی مشکلات خاص مربوط به نمونه‌برداری، خواب بذر، آلودگی‌های درون بذری و آفات و بیماری‌ها بر اهمیت موضوع افزوده است، به نحوی که در مقایسه با روش‌های سنتی اصلاح گیاهان، تسریع قابل ملاحظه‌ای در مدت اجرای برنامه-های اصلاحی به وجود آمد. امکان انجام تلاقی‌های بین جنسی، نگه‌داری ذخایر توارثی، تولید گیاهان عاری از ویروس و تولید گیاهان هاپلوییید که همه از کاربردهای مهم کشت بافت و سلول گیاهی می‌باشند (۲)، میسر شد.

نمدار گیاهی از جنس *Tilia*، خانواده *Tiliaceae*، راسته *Malvales*و بومی نیم کره شمالی می‌باشد. تنها گونه آن در ایران، *T. platyphyllos* با دو زیر گونه، در جنگل‌های نوار شمالی کشور شامل استان‌های گیلان، مازندران و گلستان از ارسباران تا آستارا و مینودشت از جنگل‌های جلگه‌ای دریای خزر تا ارتفاعات پراکنده است و معمولا به صورت انفرادی در پناه درختان راش و بلوط زیست می‌کند (۳). این گونه علاوه بر ارزش اکولوژیکی، از ارزش اقتصادی نیز برخوردار می‌باشد به‌طوری که در اروپا و آمریکا برای ایجاد فضای سبز در پارک‌ها و حاشیه خیابان‌ها کاشته می‌شود، زیرا ضمن داشتن ظاهر زیبا، سریع رشد کرده و ارتفاع زیادی پیدا می‌کند (۴). عسل و چای حاصل ازآن در سطح جهان از اشتهار ویژه‌ای برخوردار است (۵) و چوب آن بیشترین کارایی را در مجسمه‌سازی، قالب کلاه و کفش و کلیدهای پیانو دارد (۴). این گونه را می‌توان در زمره گیاهان دارویی نیز به حساب آورد. گل و برگ‌های آن مصرف پزشکی دارد و دم‌کرده آن برای معالجات مختلف از قبیل سرماخوردگی بکار می‌رود. در احیای جنگل‌های تخریب یافته و یا نیمه تخریب یافته میان‌بند تا بالابند جنگل‌های شمال می‌توان از کاشت آن به همراه گونه‌هایی نظیر راش و یا ممرز استفاده نمود (۶) چنانکه در اروپای مرکزی به میزان زیاد در برنامه‌های احیاء و جنگل‌کاری مورد استفاده قرار گرفته است (۷). نمدار درختی است رطوبت‌پسند، طالب خاک‌های مرطوب و نسبت به آب و مواد غذایی پر نیاز که اقلیم سرد یا معتدل را ترجیح می‌دهد. دارای سرشت نوری سایه‌پسند است و سیستم ریشه‌ای خود را به خوبی گسترش می‌دهد (۵،۸). تکثیر نمدار توسط بذر در جایی که خوب آبیاری شود عملی است ولی بذرهای این گونه دارای خواب دوگانه مربوط به جنین (فیزیولوژیکی) و پوشش بذر سخت و پریکارپ غیر قابل نفوذ (مکانیکی) می‌باشند. بنابراین جوانه‌زنی به سختی در مدت زمان طولانی و با درصد کم قابل انجام است (۹). مشکلات ناشی از قارچ‌های درون بذری نمدار در برخی رویش‌گاه‌ها شامل *Fusariun sp*، *Alternaria sp* و *Penicillium sp* بر مشکلات جوانه‌زنی این گونه افزوده است (۱۰). استفاده از روش‌های نوینی مثل کشت بافت برای کشت، بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی این گونه می‌تواند مفید باشد.

اولین گزارشات در زمینه کشت بافت گونه نمدار توسط Barker در سال ۱۹۶۹ ارایه شد (۹). او از طریق کالوس‌زایی اقدام به کشت بافت *T. americana* نمود. از جمله کسانی که در کشت بافت نمدار فعال بوده و تحقیقات زیادی در این زمینه انجام داده است، Chalupa است که در سال ۱۹۸۴ توانست از طریق جوانه‌های جانبی کشت درون شیشه‌ای *T. cordata* را انجام دهد (۱۱). وی در سال ۱۹۸۸ اعلام نمود کشت اندام‌های مختلف در *T. cordata* با محیط کشت MS آن‌قدر موفقیت‌آمیز است که بعد از ۵ سال برخی درختان به ارتفاع ۳-۴ متر رسیده‌اند (۱۲). وی کشت همین گونه را با محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

WPM از طریق تکثیر ساقه گزارش نمود. همچنین تکثیر درون شیشه‌ای *T. platyphyllos* را در سال ۲۰۰۳ با استفاده از انواع اکسپلنت شامل تک گره‌های مختلف ساقه (ساقه‌های حاوی جوانه‌های مختلف) و نیز جوانه‌های سوماتیکی انجام و هر دو را موفقیت آمیز اعلام نمود (۶). Yahyoglu و Ucler (1995) تاثیر دو محیط کشت MS و WPM را از طریق کشت جنین بر روی *T.rubra* بررسی کردند، نتایج نشان داد دو محیط کشت تفاوت معناداری با یک‌دیگر در میزان باززایی نداشت (۱۳). مناسب‌ترین غلظت ساکارز ۳۰ gr/lit برای هر دو محیط می‌باشد. Mala و همکاران (۲۰۰۱) میزان موفقیت تکثیر درون شیشه‌ای دو گونه نمدار *T. platyphyllos* و *T. cordata* را با استفاده از جوانه‌های زمستانه و با غلظت‌های مختلف هورمونی مورد مقایسه قرار دادند، مشخص شد میزان ساقه‌زایی در *T. cordata* بیشتر از *T. platyphyllos* بوده و در عین حال ساقه‌زایی برای اکسپلنت‌های گرفته شده از قلمه‌ها عملکرد بهتری نسبت به اکسپلنت‌های گرفته شده از درختان مسن دارند (۱۴).

باززایی موفقیت‌آمیز از جوانه‌های جانبی گونه *T. europea* به عنوان اکسپلنت (۱۵) و گونه *T. platyphyllos* (۱۶) از طریق تکثیر درون شیشه‌ای از دیگر گزارشات مربوطه است. در ایران، تنها یک تحقیق در مورد کشت بافت *T. platyphillos* توسط شهرزاد (۱۳۷۶) صورت گرفته است و در قالب طرح تحقیقاتی گزارش شده است (۱۷). مناسب‌ترین جوانه‌ها جهت کشت، جوانه‌های انتهایی یا نزدیک انتهایی، بهترین محیط کشت WPM، هورمون‌های NAA و BA به ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر برای ساقه‌زایی و هورمون IBA به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر برای ریشه‌زایی معرفی شده است. در تحقیق دیگری که توسط میتسوکوری و همکاران (۲۰۰۹) بر روی گیاه *Ponerorchis graminifolia* Rchb.f انجام گرفت، محیط کشت MS به همراه هورمون‌های BA (۴/۴۴ µM) و NAA (۴/۴۴ µM) به عنوان محیط کشت بهینه در تکثیر این گونه معرفی گردید (۱۸).

جدا کردن بافت مناسب در زمان مناسب در کشت‌های درون شیشه‌ای, مساله بسیار مهمی است، چرا که مهم‌ترین جنبه ریزازدیادی درختان بالغ سر سخت، انتخاب ریز نمونه مناسب است. در بسیاری از موارد فقط تعداد اندکی از بافت‌ها واکنش مطلوب نشان می‌دهند. همین که نوع ریزنمونه با بالاترین قابلیت ریخت‌زایی شناسایی گردید، آزمایش‌های بعدی را می‌توان برای بهینه‌سازی عکس العمل آغاز کرد. ضرورت حضور یک تنظیم کننده رشد به خصوص در محیط غذایی و اثر آن بر رشد و سیر تکاملی قطعات مورد کشت، در درجه اول وابسته به نوع و گونه گیاهی بوده که نمونه مورد کشت از آن گرفته شده است.

هدف از این پژوهش بررسی مناسب‌ترین ترکیب هورمونی محیط کشت برای تکثیر درون شیشه‌ای گونه نمدار و تعیین مناسب‌ترین ریزنمونه جهت ریزازدیادی نمدار است تا بتوان ریزازدیادی گونه نمدار را در شرایط درون شیشه‌ای بهینه‌سازی نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از جنگل توسکاستان گرگان در قطعه ۴ سری ۶ طرح گرمابدشت در ارتفاع حدود ۶۵۰ متری از سطح دریا صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و تمیز گردیدند. سپس با آب و مایع ظرفشویی شسته شدند تا کلیه آلودگی‌های سطحی حذف گردند. برای کاهش آلودگی ریزنمونه‌ها عمل پیش‌سترون‌سازی نیز بر روی آن‌ها انجام شد، بدین طریق که از اسید اسکوربیک و محلول قارچ‌کش با هدف حذف مواد فنلی و آلودگی‌های قارچی استفاده گردید. برای این‌کار ریزنمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول حاوی۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسیداسکوربیک، ۴ گرم بر لیتر قارچ‌کش کاپتان و هیپوکلریت سدیم تجاری ۵ درصد قرار داده شدند و بعد از آب‌کشی به مدت ۳ دقیقه در زیر شیر آب مورد شستشو قرار گرفتند. به دلیل آلودگی‌های مکرر، تعداد زیادی از روش‌های سترون‌سازی تست و بهترین آن انتخاب و اعمال شد که شامل قرار دادن ریزنمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول سترون کننده حاوی ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید اسکوربیک و

www.SID.ir

Archive of SID

هیپوکلریت سدیم تجاری۱۰ درصد بود. با توجه به سر سخت بودن این گونه و تست‌های مکرر مربوط به جوانه‌ها و به منظور افزایش جوانه‌زنی، سرشاخه‌ها قبل از شروع مراحل مربوط به کشت، در محلول‌های محتوی آب مقطر و هورمون‌های 2,4-D (در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر)، NAA (در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) و کنیتین ۲ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار داده شدند و اثرات آن‌ها بررسی گردید و مشخص شد قرار دادن سرشاخه‌ها در محلول محتوی آب مقطر و NAA با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر به مدت ۲۴ساعت می‌تواند در نتایج تاثیرگذار و مفید واقع شود. سایر ترکیبات و غلظت‌های مورد بررسی در نتایج تاثیر زیادی نداشتند لذا سرشاخه ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول NAA با غلظت ۱mlg^{-1} قرار داده شدند.

ریزنمونه‌های متفاوتی مورد آزمون قرار گرفت که شامل بذر کامل، بذر بدون پوسته، جنین، جوانه جانبی فلس‌دار، جوانه جانبی بدون فلس، جوانه انتهایی فلس‌دار، جوانه انتهایی بدون فلس، ساقه حاوی جوانه جانبی فلس‌دار، ساقه حاوی جوانه جانبی بدون فلس، ساقه حاوی جوانه انتهایی بدون فلس و ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار بودند.

از محیط کشت MS فاقد هورمون، حاوی g/lit ۳۰ ساکارز و g/lit ۷ آگار برای کشت اکسپلنت‌های مربوط به جنین و بذر و محیط کشت MS همراه با هورمون IBA به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر جهت کشت جوانه‌ها استفاده شد. اسیدیته برابر با ۵/۸ و دمای اتاقک رشد °C 2± 25 تحت شرایط ۱۶ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. نوع و غلظت ترکیبات به‌کار رفته در محیط کشت‌های استفاده شده در تحقیق در جدول شماره (۱) آمده است. داده‌های به‌دست آمده از تحقیق با استفاده از نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

جدول ۱- نوع و غلظت ترکیبات به کار رفته در محیط کشت‌های استفاده شده در تحقیق

Table 1- type and concentration of the used compounds in the used culture media

کد محیط کشت	Kinetinهورمون (میلی‌گرم بر لیتر)	BAPهورمون (میلی‌گرم بر لیتر)	IBAهورمون (میلی‌گرم بر لیتر)	D،4-2هورمون (میلی‌گرم بر لیتر)	NAAهورمون (میلی‌گرم بر لیتر)	ساکارز (گرم بر لیتر)	آگار (گرم بر لیتر)
۱	۱	-	۰/۲	-	-	۳۰	۷
۲	۱	-	۱	-	-	۳۰	۷
۳	۱	-	۰/۱	-	-	۳۰	۷
۴	۲	-	۰/۱	-	-	۳۰	۷
۵	۲	-	۰/۵	-	-	۳۰	۷
۶	-	۱	-	۰/۱	-	۳۰	۷
۷	-	۲	-	۰/۱	-	۳۰	۷
۸	-	-	۱	-	-	۳۰	۷
۹	-	-	۰/۱	-	-	۳۰	۷
۱۰	-	-	-	-	۰/۲	۳۰	۷
۱۱	-	-	-	-	۰/۵	۳۰	۷

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

جهت تعیین مناسب‌ترین روش جهت استریل ریزنمونه‌ها، روش‌های مختلفی تست شد که عمدتا ناموفق یا بسیار کم بازده بودند. بهترین روش تعیین و در کشت ریزنمونه‌ها استفاده شد که شامل اعمال تیمار پیش سترون و استفاده از قارچ کش در آن و تیمار سترون شامل استفاده از اسید اسکوربیک و هیپوکلریت سدیم تجاری ۱۰ درصد بود. مناسب‌ترین نوع ریزنمونه جهت ریزازدیادی نمدار بر اساس درصد جوانه‌زنی در محیط کشت پایه MS تعیین گردید. ریزنمونه‌های مورد بررسی شامل بذر کامل، بذر بدون پوسته، جنین، ساقه حاوی جوانه جانبی بدون فلس، ساقه حاوی جوانه جانبی فلس‌دار، جوانه جانبی بدون فلس، جوانه جانبی فلس‌دار، ساقه حاوی جوانه انتهایی بدون فلس، جوانه انتهایی فلس‌دار، جوانه انتهایی بدون فلس و ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار بودند. نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تاثیر نوع ریزنمونه بر میزان جوانه‌زنی ریزنمونه‌های گونه نمدار (جدول ۲) معنی‌داری در سطح یک درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تاثیر نوع ریزنمونه بر میزان جوانه‌زنی آن‌ها در گونه نمدار در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2- Variance analysis of explants type on germination in *T. platyphyllos, in vitro*

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
ریزنمونه	۱۰	۲۱۸/۴۸۵ **
اشتباه	۲۲	۹/۸۴۸
تغییرات کل	۳۲	
ضریب تغییرات (C.V) (درصد)	۴۴/۱	

**: معنی دار در سطح یک درصد

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه بر میزان جوانه‌زنی آن‌ها در شرایط درون شیشه‌ای به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد (جدول ۳) نشان داد که ریزنمونه‌ها در پنج کلاس مختلف قرار گرفتند. ریزنمونه ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار با ۲۵ درصد و جنین با ۲۰ درصد جوانه‌زنی در گروه اول و ساقه حاوی جوانه انتهایی بدون فلس با ۱۰ درصد و جوانه‌های جانبی و جوانه انتهایی بدون فلس با ۸/۳۳ درصد جوانه‌زنی در گروه بعدی قرار گرفتند. جوانه‌های جانبی و انتهایی فلس‌دار نیز درصد جوانه‌زنی بسیار پایینی را نشان دادند و بقیه ریزنمونه‌ها شامل بذر کامل، بذر بدون پوسته، ساقه‌های حاوی جوانه جانبی بدون فلس و فلس‌دار هیچ‌گونه جوانه‌زنی نداشتند.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین حاصل از بررسی اثر ریزنمونه بر میزان جوانه‌زنی نمدار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

Table 3- Results of mean comparison of the effect of explants type on germination rate in *T. platyphyllos by* Duncan's multiple range tests

ردیف	ریزنمونه	جوانه‌زنی (درصد)		ردیف	ریزنمونه	جوانه‌زنی (درصد)	
۱	بذر کامل	d	۰	۷	جوانه جانبی فلس‌دار	Cd	۳/۳۳
۲	بذر بدون پوسته	d	۰	۸	ساقه حاوی جوانه انتهایی بدون فلس	B	۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

۳	جنین	a	۲۰	۹	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	A	۲۵
۴	ساقه حاوی جوانه جانبی بدون فلس	d	۰	۱۰	جوانه انتهایی بدون فلس	Bc	۸/۳۳
۵	ساقه حاوی جوانه جانبی فلس‌دار	d	۰	۱۱	جوانه انتهایی فلس‌دار	Cd	۳/۳۳
۶	جوانه جانبی بدون فلس	bc	۸/۳۳				

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری (در سطح ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

بر اساس مشاهدات و ثبت اطلاعات از جوانه‌زنی به وجود آمده از کشت‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف، مشاهده شد که جوانه‌های حاصل از جنین‌ها در مدت زمان کمتری شروع به جوانه‌زنی نموده و کمترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به زمانی بود که از ریزنمونه جوانه انتهایی یا جانبی بدون ساقه استفاده می‌شد و هم‌چنین حداکثر رشد مربوط به ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار و بدون فلس بود، به این معنی که ریزنمونه‌های نام برده شده نسبت به جنین به زمان بیشتری برای شروع جوانه‌زنی نیاز داشتند ولی سرعت رشد بیشتری نسبت به جنین در مدت زمان مشابه پس از شروع جوانه‌زنی از خود نشان دادند. در نهایت، ریزنمونه‌های ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار و جنین به عنوان بهترین ریزنمونه انتخاب شدند (شکل ۱)

شکل ۱- ساقه‌زایی ریزنمونه‌های نمدار در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 1- Shoot regeneration of *T. platyphyllos in vitro*

اثر هورمون‌های مختلف بر میزان درصد جوانه‌زنی در دو نوع ریزنمونه برتر بر روی محیط کشت MS جامد، با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تاثیر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمونی و اثر متقابل این عوامل بر میزان جوانه‌زنی ریزنمونه‌های نمدار در شرایط درون شیشه‌ای (جدول ۴) نشان داد که نوع محیط کشت و اثر متقابل نوع محیط کشت و نوع ریزنمونه در شرایط درون شیشه‌ای در سطح یک درصد معنی‌دار بود، اما نوع ریزنمونه اثر معنی‌داری نشان نداد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمونی و اثر متقابل این دو عامل بر میزان جوانه‌زنی نمدار در شرایط درون شیشه‌ای

Table 4-Variance analysis of explants type and different hormonal concentration and interaction of these two factors on germination rate of *T. platyphyllos in vitro*

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
نوع ریزنمونه(E)	۱	۰/۰۰۱$^{n.s}$
نوع محیط کشت(M)	۱۰	۰/۱۰۸**
M×E	۱۰	۰/۰۲۴**
اشتباه	۴۴	۰/۰۰۴
تغییرات کل	۶۵	
ضریب تغییرات(C. V.) (درصد)	۲۹/۶۹	

**: معنی دار در سطح یک درصد n.s: غیر معنی‌دار

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر غلظت هورمون‌های محیط کشت بر میزان جوانه‌زنی و ساقه زایی نمدار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد در جدول (۵) آورده شده است. همان طوری که مشاهده می‌شود ترکیبات هورمونی مختلف محیط کشت در هشت گروه مجزا قرار گرفتند. محیط کشت با ترکیب هورمونی حاوی IBA به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر (کد ۹) با ۵۲/۵۰ درصد جوانه‌زنی در جایگاه اول و محیط کشت حاوی کینتین به میزان ۱ میلی‌گرم بر لیتر و IBA به میزان ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر (کد ۳) با ۳۹/۱۷ درصد جوانه‌زنی در گروه دوم قرار گرفت. محیط کشت با کد ۴ حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با ۳۰ درصد جوانه‌زنی در جایگاه بعدی قرار گرفت. محیط کشت با کد ۱۰ و با ۱۱/۶۷ درصد جوانه‌زنی و نهایتاً محیط کشت‌های با کد ۷ که حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بودند و محیط کشت حاوی NAA به میزان ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر (کد ۱۱) به ترتیب با ۱۰/۱۷ و ۸/۳۳ درصد کمترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها را به خود اختصاص دادند.

جدول ۵- نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر غلظت هورمون‌های محیط کشت بر میزان جوانه‌زنی نمدار

Table 5- The results of the mean comparison of the effect of medium hormones on the germination of *T. platyphyllos*

ردیف	کد محیط کشت	جوانه‌زنی (درصد)		ردیف	کد محیط کشت	جوانه‌زنی (درصد)	
۱	۱	d	۲۰	۷	۷	۷	f
۲	۲	de	۱۸/۳۳	۸	۸	۸	def
۳	۳	b	۳۹/۱۷	۹	۹	۹	a
۴	۴	c	۳۰	۱۰	۱۰	۱۰	ef
۵	۵	de	۱۹/۱۷	۱۱	۱۱	۱۱	f
۶	۶	de	۱۸/۳۳				

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشد از نظر آماری (در سطح ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه × نوع محیط کشت در جدول (۶) مشاهده شد که بر اساس آن‌ها داده‌های مربوط در ۱۲ گروه مختلف قرار گرفتند. بیشترین میزان جوانه‌زنی مربوط به ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بود که به تنهایی در گروه اول قرار گرفت. ریزنمونه ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار با محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و جنین با محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA هر کدام با ۴۰ درصد جوانه‌زنی در گروه دوم جای گرفتند، جنین با محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با ۳۸/۳۳ درصد جوانه‌زنی در گروه بعدی قرار گرفت که این بیان‌گر تاثیر غلظت پایین هورمون IBA و هورمون کینتین در ساقه‌زایی ریزنمونه‌های نمدار است. ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار با محیط کشت‌های حاوی ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA هر کدام به ترتیب با ۱/۶۶ و صفر درصد جوانه‌زنی کمترین میزان جوانه‌زنی را از خود نشان دادند. باززایی حاصل از ریزنمونه‌های متفاوت نمدار در شکل (۲) آمده است.

جدول ۶- نتایج حاصل از مقایسه میانگین حاصل از بررسی اثر متقابل نوع ریزنمونه × نوع محیط کشت بر میزان جوانه‌زنی نمدار در شرایط درون شیشه‌ای

Table 6- The results of mean comparison of interaction effects of explants × type of medium on germination rate of *T. platyphyllos in vitro*

ردیف	ریزنمونه	کد محیط کشت	جوانه‌زنی (درصد)		ردیف	ریزنمونه	کد محیط کشت	جوانه‌زنی (درصد)	
۱	جنین	۱	۱۸/۳۳	efg	۱۲	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۱	۲۱/۶۷	def
۲	جنین	۲	۱۶/۶۷	efg	۱۳	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۲	۲۰	d-g
۳	جنین	۳	۳۸/۳۳	bc	۱۴	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۳	۴۰	b
۴	جنین	۴	۳۱/۶۷	bcd	۱۵	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۴	۲۸/۳۳	cde
۵	جنین	۵	۲۰	d-g	۱۶	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۵	۱۸/۳۳	efg
۶	جنین	۶	۱۸/۳۳	efg	۱۷	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۶	۱۸/۳۳	efg
۷	جنین	۷	۸/۶۶	ghi	۱۸	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۷	۱۱/۶۷	fgh
۸	جنین	۸	۸/۳۳	ghi	۱۹	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۸	۲۳/۳۳	def
۹	جنین	۹	۴۰	B	۲۰	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۹	۶۵	a
۱۰	جنین	۱۰	۲۱/۶۷	def	۲۱	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۱۰	۱/۶۶	hi
۱۱	جنین	۱۱	۱۶/۶۷	efg	۲۲	ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار	۱۱	۰	i

- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشد از نظر آماری (در سطح ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲- باززایی حاصل از ریزنمونه‌های نمدار: ۱) گیاه‌چه حاصل از جنین، ۲) کالوس حاصل از جنین، ۳) ساقه‌زایی حاصل از ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار، ۴) ساقه‌زایی حاصل از ساقه حاوی جوانه انتهایی بدون فلس

Figure 2- Regeneration of *T. platyphyllos* explants: 1) plantlet derived from embryos, 2) shoot regeneration from the embryos, 3) shoot regeneration from stem containing the terminal bud with scale, 4) Shoot regeneration of stem containing terminal bud without scales

پس از به‌دست آوردن بهترین تیمار برای شاخه‌زایی، شاخه‌های نمدار به میزان مناسب تکثیر و هنگامی که طول هر شاخه به حد مناسبی رسید (حدود ۲ تا ۳ سانتی‌متر) وارد مرحله ریشه‌زایی گردیدند. بدین منظور از ۲ روش استفاده شد، در روش اول، ساقه‌های ایجاد شده، در محیط کشت پایه فاقد هورمون حدود ۱۵ تا ۲۰ روز، مستقر و سپس به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. در روش دوم، ساقه‌های تشکیل شده مستقیماً و بلافاصله در محیط کشت‌های مناسب ریشه‌زایی قرار داده شدند. محیط کشت‌های مورد استفاده مخصوص ریشه‌زایی، شامل محیط کشت MS حاوی اکسین‌های NAA با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و IBA با غلظت های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر و هورمون 2،4-D بوده است. براساس آزمایشات انجام شده، هیچ کدام از تیمارهای انجام شده در مرحله اخیر ریشه‌زایی، موفق به ریشه‌دار نمودن ساقه‌های ایجاد شده نگردید و این مرحله احتیاج به تحقیق بیشتر و تیمارهای ریشه‌زایی بیشتری خواهد داشت.

بحث و نتیجه گیری

ابزارهای بیوتکنولوژی نظیر کشت بافت می‌تواند یکی از راه‌های غلبه بر مشکلات جوانه زنی گونه‌های مختلف گیاهی از جمله درختان جنگلی باشد. نمدار، از گونه‌های گیاهی با ارزش و با دیر زیستی طولانی (گاهی تا هزار سال) با دامنه وسیع پراکنش ارتفاعی می‌باشد. بر اساس اطلاعات جمع‌آوری شده از نهالستان های شمال کشور، تولید نهال نمدار تاکنون با مشکلات جدی مواجه بوده است (۱۹). روش‌های کشت بافت ممکن است بتوانند راه حل مناسبی برای حل مشکل فوق باشند. موضوع کنترل آلودگی‌ها در شرایط کشت بافت شاید مهم‌ترین مساله در مورد کشت بافت نمدار و یا هر گیاهی باشد که ریزنمونه‌های آن‌ها از محیط خارج، خصوصاً محیط‌های جنگلی گرفته می‌شود که دارای آلودگی‌های فراوانی می‌باشند. با توجه به این مساله که پیش‌سترون‌سازی یک مرحله مقدماتی برای کاهش میزان آلودگی ریزنمونه‌های مورد استفاده در کشت بافت است و با در نظر گرفتن این موضوع که این مرحله در خارج از اتاقک رشد، که استریل نمی‌باشد، انجام می‌گیرد، نمی‌توان پیش‌سترون‌سازی را به عنوان یک مرحله مستقل در محاسبات وارد نمود، اما با توجه به تجربیات به دست آمده در این تحقیق و با علم به این موضوع که نمی‌توان اثر پیش‌سترون‌سازی را از محاسبات حذف نمود، این مرحله به عنوان یک پیش نیاز برای مرحله سترون‌سازی در نظر گرفته شد و از قارچ کش جهت کاهش آلودگی‌های قارچی فراوان موجود در کشت ها استفاده گردید. در رویش‌گاه مورد مطالعه قارچهای *Penicillium sp.*، *Fusarium sp.* و *Alternaria sp.* همراه بذور نمدار جداسازی و شناسایی شده بود (۱۰). استفاده از قارچ‌کش کاهش چشم‌گیری در آلودگی‌های قارچی به دنبال داشت که با نتایج تحقیق شهرزاد در سال ۱۳۷۶ مطابقت دارد (۱۷). از

www.SID.ir

Archive of SID

یازده نوع ریزنمونه مورد بررسی، ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار و جنین جدا شده از بذر، بیش‌ترین میزان جوانه‌زنی را از خود نشان دادند. جوانه انتهایی فلس‌دار نیز در جایگاه بعدی در بین ریزنمونه‌های مورد استفاده از نظر جوانه‌زنی قرار گرفت. ریزنمونه‌های کشت شده به صورت ساقه حاوی جوانه جانبی فلس‌دار، ساقه حاوی جوانه جانبی بدون فلس، بذر کامل و بذر بدون پوسته هیچ گونه جوانه‌زنی از خود نشان ندادند. عدم جوانه‌زنی در بذور کشت شده بدون پوسته به علت وجود موسیلاژ و مواد فنولی فراوان بوده است. موسیلاژها باعث جلوگیری از ارتباط بین ریزنمونه و محیط کشت شده و مواد فنولی، قهوه‌ای شدن محیط کشت و ایجاد آلودگی بیش از حد را به دنبال دارند. این عوامل باعث عدم جوانه‌زنی و بیشترین میزان آلودگی در این ریزنمونه‌ها می‌شون (۱۷). عدم جوانه‌زنی ساقه حاوی جوانه جانبی در هر دو حالت فلس‌دار و بدون فلس، شاید به دلیل وجود دو محل قطع ساقه در بالا و پایین جوانه جانبی و نتیجتا افزایش میزان ترشحات مواد فنولی باشد. استفاده از اسیداسکوربیک در مرحله پیش‌سترون‌سازی و سترون‌سازی به تنهایی نمی‌تواند جلوی ترشح کامل مواد فنولی را بگیرد و باعث آلودگی در محیط کشت می‌شود. ضمن این‌که به علت عدم تماس مقطع بالایی ساقه با محیط کشت، جذب مواد از محیط کشت کاهش یافته و اسیداسکوربیک کمتری جذب ریزنمونه می‌شود، اسیداسکوربیک نمی‌تواند نقش اصلی خود یعنی کاهش مواد فنولی را ایفا نماید. بر اساس اطلاعات موجود، سفت و سخت بودن پوسته (پریکارپ) بذر نمدار که مانع از جذب آب، گازها و نور می‌شود به عنوان یک عامل فیزیکی از جوانه‌زنی بذر جلوگیری می‌کند یا باعث تاخیر آن می‌شود (۲۰). این عامل مانع ارتباط بین بذر و محیط کشت شده و به علت عدم جذب عناصر لازم توسط بذر کامل در محیط کشت جوانه‌زنی صورت نمی‌گیرد، این موضوع حتی در مورد بذوری که پوسته‌شان هنوز به اندازه کافی تکامل نیافته‌اند نیز صدق می‌کند. ممکن است عوامل هورمونی موجود در پوسته بذر نمدار باعث این عامل باشد که باید در تحقیقی جداگانه به آن پرداخته شود. در تحقیق حاضر مناسب‌ترین ریزنمونه ها، جنین و تک گره‌های حاوی جوانه انتهایی دارای فلس تشخیص داده شد. Chalupa نیز در سال ۲۰۰۳ از ریزنمونه‌های تهیه شده از بذر، در کشت بافت نمدار با استفاده از بافت‌های جنینی توانست باززایی نرمال و متناسبی به‌دست آورد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۶). Yahyoglu و Ucler در سال ۱۹۹۵ در تکثیر *T.rubra* به نتایج کاملاً متفاوتی با نتایج حاصل از این تحقیق دست یافتند، به طوری که از جنین بذر هیچ گونه جوابی نگرفتند، در صورتی که از بذر بدون پوسته توانستند ریشه‌زایی بگیرند که نتایج‌شان در نوع خود منحصر به فرد می‌باشد (۲۱). شهرزاد در سال ۱۳۷۶ بهترین نوع ریزنمونه را در گونه *Tilia platyphyllos*، جوانه انتهایی و نزدیک انتهایی تعیین نمود (۱۷). Chalupa نیز در سال ۱۹۸۸ بعد از چندین سال بررسی بر روی *T.cordata*، جوانه‌های انتهایی را به عنوان بهترین ریزنمونه معرفی نمود. Sarvasova و Durkovic در سال ۲۰۰۲ در ریزازدیادی *T.europea* بهترین نوع ریزنمونه را جوانه جانبی معرفی کردند که با نتایج حاصل از این تحقیق مغایرت دارد (۱۵).

دو نوع ریزنمونه اصلی که بیشترین میزان جوانه‌زنی را از خود نشان دادند، یعنی جنین و ساقه حاوی جوانه انتهایی فلس‌دار در محیط کشت‌های حاوی هورمون‌های مختلف کشت و داده‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین میزان ساقه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود و محیط‌کشت‌های کد ۳ (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین) و کد ۴ (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین) و هم‌چنین کد ۱ (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA با یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین) در رتبه‌های بعدی از نظر بیشترین میزان جوانه‌زنی و نهایتا ساقه‌زایی قرار گرفتند. Chalupa در سال ۲۰۰۳ به این نتیجه رسید که با کاهش غلظت سیتوکنین و افزایش هورمون گیاهی IBA تکثیر ساقه سرعت بیشتری پیدا می‌کند که این موضوع با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد (۷). شهرزاد (۱۳۷۶) نیز بهترین تنظیم کننده رشد را IBA با غلظت۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر معرفی نمود، اگرچه بهترین محیط کشت را WPM

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین کرد (۱۷). شایان ذکر است کـه در تحقیـق انجـام شـده توسط کنتسا و همکاران (۲۰۱۱) بر روی گونه ای از فندق نیـز IBA اثرات معنی داری بـر روی جوانـه زنـی و تشـکیل جوانـه داشته است (۲۲).

با وجود اعمال تیمارهای مختلف ریشه‌زایی حاصل نشد ولـی Sarvasovaو Durkovic (۲۰۰۲) بـه راحتـی و فقـط بـا اعمال هورمـون NAA توانسـتند ریشـه‌زایـی خـوبی در مـورد گونه *T. europea* به دست آورند (۱۵). این مرحله احتیاج به تحقیق بیشتر و تیمارهای ریشه‌زایی بیشتری خواهد داشت.

نتیجه گیری: در این مطالعه، پروتکل تکثیر و ریزازدیادی گونه نمدار در شرایط درون شیشه ای ارایه شد. این نتایج به منظور اهداف متفاوتی از قبیل تکثیر انبوه، مطالعات پایه در کارهای اصلاح نژاد و مولکولی به‌خصوص در تولید گیاهان تراریخته می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Salehi, M., Hosseini, B., Jabbarzadeh. Z. (2014). High–frequency in vitro plantlet regeneration from apical bud as a novel explant of *Carum copticum* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Vol. 4, No. 1, pp. 424-428.
2. Froutan, A., Vadidar, (2006). Plant tissue culture. Sepehr publication center, pp. 296
3. Sabeti, H. (1995). Trees and shrubs of Iran. Yaz university Press, pp. 750
4. Edlin, H.L.(1976). Trees. pp. 224
5. Haller, J.M. (1995). *Tilia americana*, linden: a neglected jewel. Arbor Age, Vol. 15, No. 7, pp. 32-33
6. Sadati, S.E., Emadian, S.F., Jalilvand, H., Mokhtari, J., Tabari, M. (2007). Influence of Some Topographic Factors on Distribution of Large-Leaved Lime (*Tilia platyphyllos* Scop.) in Vaz Forest. JWSS - Isfahan University of Technology, Vol. 11, No. 41, pp. 443-452
7. Chalupa, V. (2003). *In vitro* propagation of *Tilia platyphyllos* by axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis.
8. Kunneman, B.P., Albers, M.R.J. (1991). Linden trees *(Tilia* spp.). In: Bajaj YPS, ed. Biotechnology in agriculture and forestry. Trees, Vol. 3, No. 16, pp. 152-163
9. Barker, W. (1969). Behavior in vitro of plant cells from various sources within the same organism. Can. J. Bot, Vol. 47, pp. 1334-1336
10. Mehrdad, M., Payamnour, V., Ghasemi Bezdi, K., Kavousi, M.R., Zhand, S. (2010). Isolation and Identification of fungi associated with seeds using in tilia species (*Tilia begonifoila*).
11. Chalupa, V. (1984). *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.).The Journal of the Biologia Plantarum, Vol. 26, No. 5, pp. 374-377
12. Chalupa, V. (1988). *In vitro* propagation of small-leaved linden (*Tilia cordata*), black locust (*Robinia pseudoacacia*) and mountain ash (*Sorbus aucuparia*) and growth of trees cultivated *in vitro.* The Journal of the Lesnictví, Vol. 34, No. 8, pp. 705-720
13. Yahyaoglu, Z., Ucler, A.O. (1995). *In vitro* plantlet regeneration from embryos of Caucasian linden (*Tilia rubra*). Turkish Journal of Agriculture & Forestry, Vol. 19, No. 4, pp. 231-235
14. Mala, J., Machova, P., Cvrckova, H. (2001). Micropropagation of linden.

www.SID.ir

Archive of SID

Zpravy Lesnickeho Vyzkumu, Vol. 46, No. 3, pp. 147-149

15. Sarvasova, I., Durkovic, J. (2002). *In vitro* regeneration of European linden.The Journal if the Biologia Plantarum, Vol. 45, No. 1, pp. 149-152
16. Mauleova, M., Vítamvas, J., Tusek Z. (2004). *In vitro* propagation of important deciduous forest tree species. Zpravy Lesnickeho Vyzkumu, Vol. 49, No. 1/4, pp. 3-6
17. Shahrzad, Sh. (1997). Tilia (*Tilia platyphyllos*) Micropropagation through tissue culture. Final report of research. Research Institute of Forests and Rangelands.
18. Mitsukuri, K., Mori, G., Johkan, M., Shimada, Y., Mishiba, K.-I. , Morikawa, T., Oda, M. (2009). Effects of explant position and dark treatment on bud formation in floret culture of *Ponerorchis graminifolia* Rchb.f. Vol. 121. No. 2. Pp. 243-247.
19. Tabari, M., Tabandeh, A. (2007). Germination response of treated seed of tilia to irrigation and seed culture depth. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, Vol. 15, No. 2, pp. 144-151
20. Spaeth, J.N. (1934). A physiological study of dormancy in *Tilia* seed. Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir, Vol. 169, p. 1-71
21. Ucler, A.O., Mollamehmetoglu, N. (2001). *In vitro* plantlet regeneration from mature embryos of linden (*Tilia platyphyllos* Scop.) and multiplication of its buds. Turkish Journal of Agriculture & Forestry, Vol. 25, No. 3, pp. 181-186.

www.SID.ir