دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۲، صفحه ۲۴۶-۲۳۷ (۱۳۹۴)

تکثیر افراکیکم (*Acer monospessulanum*) از طریق کشت بافت

اعظم سعیدی حیدری[۱] و عباس صفرنژاد[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی و اصلاح گیاهان زینتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲*-نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۶

چکیده

جنس افرا (*Acer*)، درختان خزان‌کننده متعلق به خانواده افرا (*Acereacea*) می‌باشد. افرا*Acer monospessulanum* از جمله گیاهانی است که در خطر انقراض قرار دارد و ریشه‌دار کردن قلمه و جوانه‌زنی بذر آن به سختی انجام می‌شود. از این‌رو هدف از انجام این تحقیق تعیین محیط کشت بهینه جهت باززایی گیاه افرا از طریق کشت بافت بود. محیط کشت استفاده شده محیط MS بود که از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین با ترکیبات و غلظت‌های مختلف برای باززایی استفاده شد. بهترین تیمار برای سترون‌سازی جوانه‌ها محلول ۰/۵ درصد قارچ‌کش به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۰/۱ درصد کلرید جیوه به‌مدت ۳ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت سدیم به‌مدت ۲۰ دقیقه شناخته شد. از محیط کشت پایه MS همراه با تیمارهای هورمونی مختلف استفاده شد. آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط جهت باززایی حاوی ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. بهترین محیط جهت پرآوری از جنین بذری محیط MS با دو برابر آهن همراه با ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. ریشه‌زایی در محیط MS ½، با دو برابر آهن و بدون هورمون مشاهده شد. گیاهچه با رشد مناسب و ریشه‌دار به جیفی‌پات منتقل و پس از سازگاری به گلدان و در نهایت به‌خاک منتقل شد.

واژه‌های کلیدی: افرا کیکم، کشت بافت، هورمون‌های گیاهی.

مقدمه

افرا کیکم (*Acer monospessulanum*) یکی از گونه‌های مهم جنس *Acer* از خانواده *Aceraceae* است (Mozaffarian.,1383). این گونه در ایران با توجه به زیرگونه‌ها و رویشگاه‌ها، تحت عنوان کرکو، کیکم کردستانی، کی‌کف، کهوک یا کیکم قفقازی ، سیاه کرکو یا کیکم ترکمن، کیکم شیرازی و کیکم ایرانی شناخته می‌شود (Sabety.,1992; Sagheb Talebi.,2004).

زیرگونه *turcomanicum* که تحت نام کیکم ترکمن یا سیاه کرکو در ایران شناخته می‌شد، امروزه یکی از زیرگونه‌های کرکو به‌حساب می‌آید. این زیرگونه در جنگل‌های ناحیه رویشی ایران تورانی به‌عنوان گونه همراه ارس در ارتفاعات استان‌های خراسان رضوی و شمالی انتشار دارد (Sabety, 1992). طبق طبقه‌بندی Sagheb

Archive of SID

www.SID.ir

Talebi و همکاران (۲۰۰۴) این گونه جزو گونه‌های در حال انقراض و در گروه ذخایر طبیعی مدیریت یافته قرار گرفته است. این گونه در نواحی شمال شرق کشور انتشار دارد و از گرگان، جنگل‌های کتول و شاهوارکوه و رامیان و تیل‌آباد شاه‌پسند تا شمال خراسان، بجنورد، قوچان و شیروان امتداد دارد. حد پایین آن در بجنورد ۱۱۰۰ متر و حد بالای آن در شاهوار کوه ۲۴۰۰ متر از سطح دریا است.

در کشت درون شیشه‌ای *Acer platanoides* استقرار ریزنمونه ها در محیط کشت MS با ۵ میکرومولار BA و ۵ – ۰/۵ میکرومولار IBA صورت گرفت (Cheng *et al*., 1980). بر اساس نظر Ďurkovič (1996) کاینتین در باززایی *Acer platanoides* مؤثر است. در بررسی‌هایی که روی ریزنمونه‌های گرفته شده از شاخه‌های جانبی *Acer palmatum* انجام شد، محیط کشت WPM برای استقرار ریزنمونه ها بهتر تشخیص داده شد و همچنین TDZ در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان شاخه‌زایی را داشت (Fernandez *et al*., 2000). کشت ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده از *Acer mono* var. *marmoratum* در فصل زمستان در محیط کشت WPM با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین منجر به باززایی شد (Yamamoto *et al*., 2009). مشکلات تکثیر جنسی این گیاه از طریق بذر، چرای مفرط و بدشکلی توده‌های جنگلی است که سبب ایجاد بذرهای نارس و آفت‌زده با قوه نامیه نامناسب می‌شود. از طرفی بذرهای کیکم به‌دلیل خشک شدن سریع قادر به زنده‌مانی در طولانی‌مدت نبوده و این مشکل، جنگلکاران را به تکثیر غیرجنسی گونه مزبور متمایل کرده است. در مورد بیشتر گونه‌های سخت چوب نظیر افرا به‌دلیل طولانی بودن دوره جوانی، عدم گلدهی مناسب و مشکل ریشه‌دهی قلمه ها به ریزازدیادی آن‌ها توجه خاص شده است (Babaeian, 2001). کمبود نهال کیکم در منطقه و کندی رشد آن‌ها، پوکی غالب بذرها و قوه نامیه نامناسب آن‌ها نیز مزید بر علت شده و باعث شده تا ریزازدیادی گونه مزبور هم از طریق کشت جوانه دارای اهمیت خاصی باشد. هدف از این تحقیق تعیین بهترین تیمار ضدعفونی برای کاهش آلودگی و همچنین بهترین محیط کشت جهت باززایی به‌منظور تکثیر آسان‌تر گونه مورد نظر از طریق درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذرها در تیرماه و سرشاخه‌های گیاه افرا در فصول مختلف از رویشگاه طبیعی آن در ذخیره‌گاه جنگلی کلاته چنار شهرستان درگز که در فاصله ۴ کیلومتری غرب روستای ارباب و ۶۸ کیلومتری شمال غرب شهر درگز در مجاورت مرز ایران و ترکمنستان واقع شده است تهیه شد. ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش شامل جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی و بذر که در فصول مختلف سال جمع‌آوری شدند. برای تهیه ریزنمونه جوانه پس از جداسازی کلیه برگ‌ها، شاخه‌ها به قطعاتی به‌طول ۴-۳ سانتی‌متر تقسیم شده، بذرها نیز پس از باله‌برداری با توجه به آلودگی شدید جوانه ها به منظور کاهش آلودگی های باکتریایی به‌مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفتند. قطعات شاخه‌های دارای جوانه پس از شستشو با آب جاری به قطعات کوچک‌تر (هر قطعه دارای یک جوانه) تقسیم شدند و به‌منظور ضدعفونی سطحی از محلول‌های مختلف استفاده شد (جدول-۱). برای ضدعفونی بذرها از تیمارهای۴ و ۵ از جدول ۱ استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تیمارهای به‌کار برده شده در ضدعفونی سطحی شاخه‌های افرا کیکم

ردیف	تیمارهای ضدعفونی
۱	کلرید جیوه ۰/۰۲ درصد(۳ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد (۱۵ دقیقه)
۲	الکل ۷۰ درصد (۱ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۳۷/۵ درصد (۲۰ دقیقه)
۳	هیپو کلریت سدیم ۳۷/۵ درصد (۲۰ دقیقه)
۴	قارچ‌کش ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) +کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه) +هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد (۲۰ دقیقه)
۵	قارچ‌کش ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۰۵ درصد (۱ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه) + هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد (۲ دقیقه)
۶	قارچ‌کش ۰/۱ درصد (۱۵ دقیقه) +کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد (۲۰ دقیقه)
۷	قارچ‌کش ۰/۱ درصد (۱۵ دقیقه)+ کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)+۴ الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد (۳۰ دقیقه)
۸	قارچ‌کش ۰/۱ درصد (۱۰ دقیقه) +کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه)+۴ الکل ۷۰ درصد (۳ دقیقه)+ هیپوکلریت سدیم ۴۰ درصد (۲۰ دقیقه)

بعد از ضدعفونی، نمونه‌ها روی محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ترکیب مختلف از مواد تنظیم‌کننده رشد (جدول ۲) کشت و به اتاقک رشد منتقل شدند و در انتهای هر دوره یادداشت برداری‌های لازم روی باززایی جوانه‌ها انجام شد. به‌منظور باززایی جنین بذری، در زیر هود لامینار و به نحوی که به جنین بذر آسیب وارد نشود، پوشش بذرها جدا شده و در ۴ تکرار در محیط پایه کشت شدند. پس از ده روز گیاهچه بذری رشد کرد اما به‌علت رشد زیاد لپه‌های بذری و فرو رفتن جنین در محیط کشت لپه‌های بذری در واکشت بعدی قطع شد.

جدول ۲- مقادیر مواد تنظیم‌کننده رشد مربوط به محیط باززایی جوانه در محیط پایه MS

شماره محیط کشت	محتوای هورمونی
۱	(3mg/L) Kin + (0.1 mg/L) IBA
۲	(5mg/L) BAP + (0.1mg/l) IBA
۳	(3mg/L) BAP
۴	(0.0002mg/L) TDZ
۵	(0.002mg/l) TDZ
۶	(0.02mg/l) TDZ

پس از قطع لپه‌ها، گیاهچه رشد یافته به محیط MS با دو برابر آهن و ۴ ترکیب هورمونی انتقال یافت (جدول ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

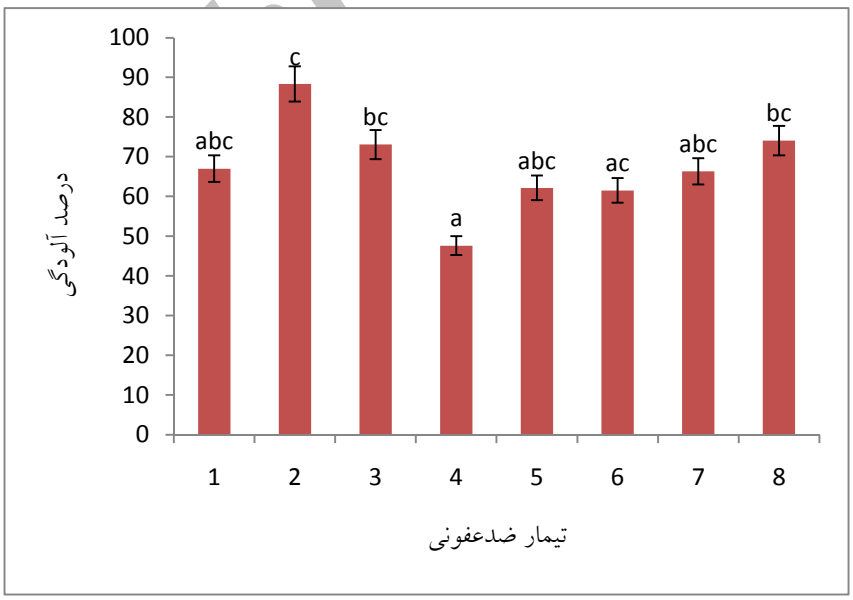
جدول ۳- مقادیر هورمونی مربوط به محیط پرآوری

شماره محیط کشت	محیط پایه	محتوای هورمونی
۱	MS	(0.005mg/L) TDZ + (0.5mg/L) Kin
۲	MS	(0.01mg/L) TDZ
۳	MS	(0.02mg/L) TDZ
۴	MS	بدون هورمون

پس از دستیابی به بهترین تیمار شاخه‌زایی، هنگامی که طول شاخه به اندازه مناسب رسید وارد مرحله ریشه‌زایی شدند. در این مرحله شاخه‌ها به محیط ½MS فاقد هورمون منتقل شدند. پس از ریشه‌دار شدن گیاهچه‌های حاصل به گلدان همراه با سرپوش پلاستیکی و سپس به گلدان و خاک منتقل شدند.

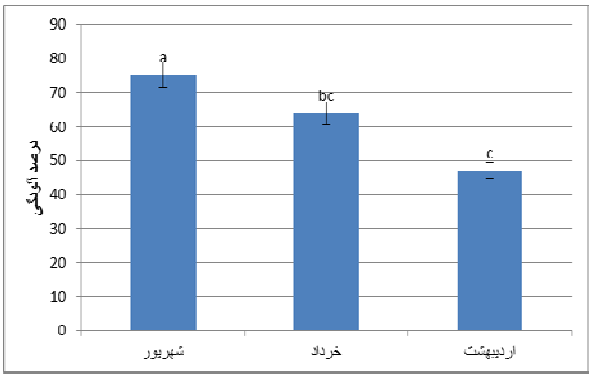
نتایج

به‌منظور کاهش آلودگی و بهینه‌سازی روش سترون-سازی از تیمارهای مختلف برای به‌دست آوردن بهترین روش ضدعفونی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد استفاده وجود داشت. نتایج حاصل نشان داد که تیمار ۴ یعنی قارچ‌کش ۰/۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (۳ دقیقه) + هیپوکلریت ۳۰ درصد (۲۰ دقیقه) کمترین میزان آلودگی را داشت (شکل ۱). همچنین در اردیبهشت ماه کمترین میزان آلودگی مشاهده شد (شکل ۲).



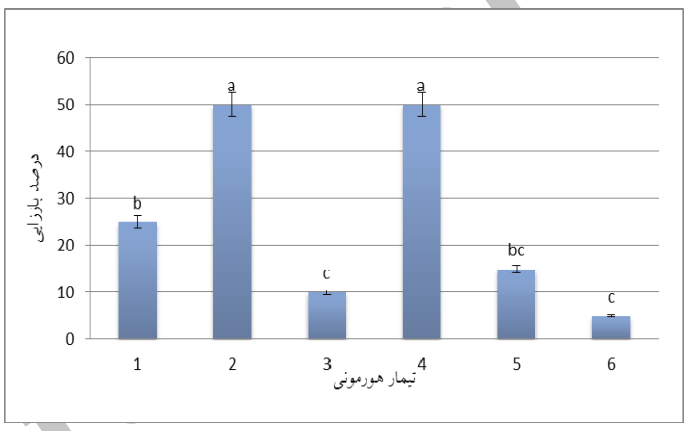
شکل ۱- مقایسه اثر تیمارهای ضدعفونی (تیمارهای ضدعفونی در جدول ۱ معرفی شده‌اند)

Archive of SID
www.SID.ir

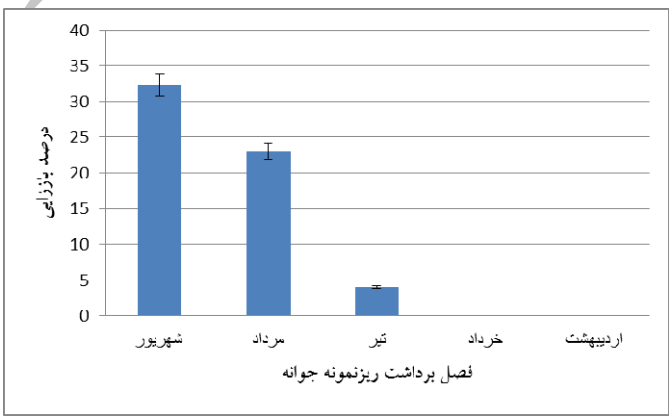


شکل ۲–مقایسه اثر فصل تهیه ریزنمونه در میزان آلودگی

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای ضدعفونی بذر، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های مختلف هورمونی جهت باززایی، پس از یک ماه جوانه‌ها شروع به رشد کردند (شکل۴). همچنین نتایج نشان داد بهترین زمان جهت باززایی ریزنمونه‌ها اواخر پاییز بود. بهترین ترکیب هورمونی حاوی ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA بود (شکل ۳).



شکل ۳– مقایسه اثر تیمارهای هورمونی (تیمارهای هورمونی در جدول ۲ معرفی شده‌اند)



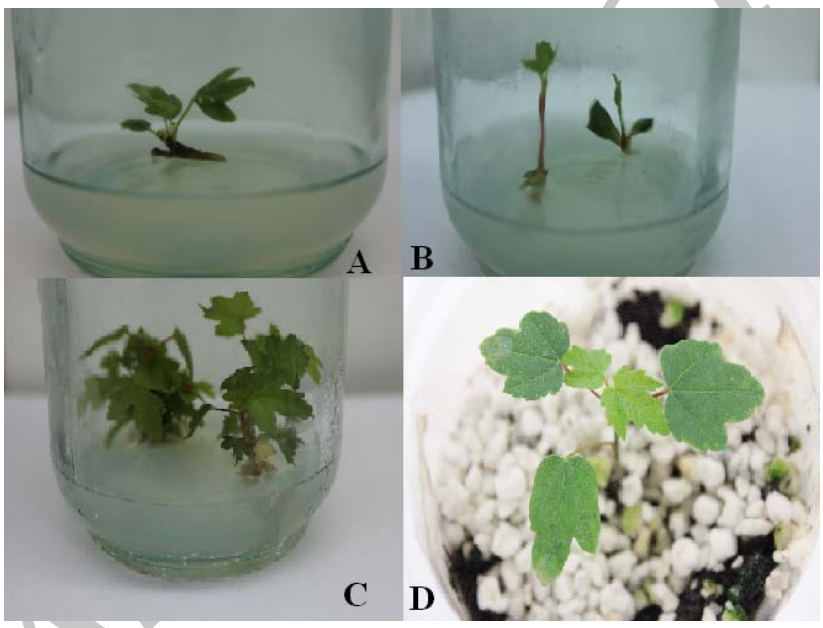
شکل ۴– مقایسه اثر تیمارهای هورمونی در زمان‌های مختلف

www.SID.ir

جنین‌های بذری کشت شده در محیط بدون هورمون پس از ۱۰ روز شروع به متورم شدن کردند، همزمان با تورم جنین بذری، لپه‌ها نیز رشد کردند، رشد زیاد لپه‌ها باعث فرورفتن برگ‌های اولیه در محیط کشت و از بین رفتن ریزنمونه شد. به‌منظور جلوگیری از فرورفتن ریزنمونه در محیط کشت، در واکشت لپه‌ها قطع شدند و گیاهچه‌ها به محیط کشت پرآوری منتقل شدند.

پس از کشت جوانه‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف هورمونی پرآوری انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای هورمونی از نظر تعداد شاخه تولیدی بود. با بررسی تیمارهای هورمونی مختلف مشخص شد که بهترین محیط جهت تشکیل بیشترین تعداد شاخه (۱۴عدد) محیط MS با دو برابر آهن و حاوی۰/۰۰۵میلی‌گرم بر لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin بود.

پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط بدون هورمون ریزقلمه‌ها با موفقیت ریشه‌دار شدند. ریشه‌زایی در محیط MS ½ بدون هورمون صورت گرفت به‌طوری‌که طول ریشه‌ها به ۱۴ سانتی‌متر رسید. به‌منظور سازگاری، ریزنمونه‌های ریشه‌دار به گلدان همراه با سرپوش پلاستیکی انتقال یافتند (شکل ۵).



شکل۵ – A – ریزنمونه جوانه کشت شده در محیط باززایی پس از یک ماه، B – ریزنمونه جنین بذری کشت شده در محیط باززایی پس از یک ماه، C – نمونه حاصل از پرآوری، D– نهال سازگار شده

بحث

مهم‌ترین منبع آلودگی در کشت بافت، ریزنمونه گیاهی می‌باشد که باید قبل از قرارگرفتن در محیط کشت به‌خوبی ضدعفونی گردند. نتایج این پژوهش نشان داد که از بین تیمارهای اعمال شده برای سترون‌سازی ریزنمونه جوانه، کاربرد هیپوکلریت سدیم به‌تنهایی جهت ضدعفونی، بالاترین درصد آلودگی را (۸۸/۳۳ درصد) از خود نشان داد و استفاده از قارچ‌کش ۰/۵ درصد به‌همراه کلریدجیوه ۰/۱ درصد، به‌طور قابل توجهی درصد آلودگی را پائین آورد. در تیمار ۴ از قارچ‌کش ۰/۵ درصد استفاده شد که باعث آلودگی ۴۷/۶۱ درصد شده بود این میزان کاهش آلودگی نسبت به آلودگی ۶۱ درصد در تیمار مشابه آن (تیمار ۶) ولی با میزان قارچ‌کش ۰/۱ درصد می‌تواند به‌علت افزایش میزان قارچ‌کش باشد. این نتایج نشان داد که استفاده از

www.SID.ir

قارچ‌کش برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی لکه قیری افرا و کلرید جیوه برای از بین بردن باکتری شاید مؤثر باشد. در بررسی بر روی *Acer freemanii* در اواسط فروردین تا اواسط تیرماه از شاخه‌های نیمه چوبی یک‌ساله درختان نمونه‌گیری انجام شد، ریزنمونه دارای گره با مواد شوینده مایع به‌مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد و در زیر آب جاری به‌مدت ۳۰-۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۴ دقیقه و در نهایت ۵ بار با آب مقطر استریل ضدعفونی شد (Zhao *et al*., 2012). در پژوهشی که توسط O'Connor و همکاران (2007) صورت گرفت، برای ضدعفونی شاخه‌های انتهایی *Acer grandidentatum Nutt* ابتدا شاخه‌ها با آب جاری به‌مدت ۲ دقیقه شستشوی سطحی داده شد و در ادامه با هیپوکلریت سدیم (کلراکس ۳۵ درصد) و ۲ قطره مایع ظرف‌شویی به‌مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و درنهایت در آب مقطر استریل شستشو داده شد. همچنین Lattier و همکاران (۲۰۱۲) در ریزازدیادی *Acer platanoides* ، ریزنمونه‌ها ابتدا را به‌مدت ۴ ساعت در زیر آب جاری قرار دادند. سپس به‌منظور استریل‌کردن از محلول حاوی ماده ضدعفونی‌کننده سطحی ۲۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۶/۱۵ و ۲ قطره توئین ۲۰ به‌مدت ۱۷ دقیقه و در نهایت ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل استفاده کردند و نتایج موفقیت‌آمیزی به‌دست آوردند که با نتایج این پژوهش هم‌سو نبود. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که گونه افرا کیکم به‌دلیل خشکسالی اخیر در معرض حمله آفات و بیماری‌ها قرار گرفته است. نتایج آلودگی فصلی نشان داد که میزان آلودگی در شهریور ماه بسیار بالا بود که این امر می‌تواند به‌علت بیماری‌های کال که عامل آن باکتری و لکه قیری افرا که توسط دو گونه قارچ از رده آسکومیست و شاخه آسکومیکوتا به‌نام‌های *Rhytisma acerinum* و *R. punctatum*ایجاد می‌شود باشد. اولین علائم بیماری در حدود ۴ تا ۶ هفته بعد از خروج آسکوسپورها از برگ های خزان شده در اواسط خرداد تا اواخر تیر ظاهر شد. در اواخر تابستان لکه های سیاه قیری شکل سطح وسیعی از برگ‌ها را فرا گرفته و باعث خزان زود هنگام برگ‌ها و کاهش رشد درختان می‌شود (Borhani, 2008). تیمار ضدعفونی شماره ۴ و ۶ یکسان و فقط در میزان قارچ‌کش متفاوت می‌باشد. نتایج نشان دادند که تیمار شماره ۴ که از قارچ‌کش ۰/۵ درصد استفاده شده بود میزان آلودگی کمتری نسبت به تیمار شماره ۶ با قارچ‌کش ۰/۱ درصد نشان داد. این امر حکایت از این داشت که استفاده از قارچ‌کش شاید در کاهش آلودگی سطحی مؤثر باشد. باززایی اولیه از ریزنمونه‌های جوانه که در اواخر تابستان جمع‌آوری شد پس از یک ماه از کشت صورت گرفت. در صورتیکه ریزنمونه‌هایی که در اواخر بهار جمع‌آوری شد پس از دو هفته باززایی اولیه مشاهده شد. در بررسی بر روی ریزازدیادی *A. rubrum* گزارش شده است که سه هفته بعد از کشت ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده از قلمه‌های چوب سبز در بهار در محیط کشت MS حاوی ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر TDZ باززایی صورت می‌گیرد در حالی که باززایی از ریزنمونه‌های جمع‌آوری شده از قلمه‌های چوب سبز در پاییز، هشت هفته بعد از کشت صورت می گیرد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (Wann & Gates, 1993). گزارش شده است که تغییرات فصل در میزان ریزازدیادی ریزنمونه جوانه در گیاهان چوبی چندساله مؤثر است و تصور می‌شود این امر مربوط به رکود داخلی جوانه باشد (Fukui *et al*., 1990). باززایی به صورت مستقیم یا غیرمستقیم صورت می‌گیرد. در روش مستقیم گیاهچه مستقیماً و بدون تشکیل توده سلولی تمایز نیافته یا کالوس به‌وجود می‌آید. در باززایی مستقیم، گیاه تولید شده مشابه گیاه والد بوده ولی در باززایی غیرمستقیم امکان بروز تغییرات ژنتیکی و عدم ثبات ژنتیکی وجود دارد. محیط کشت پایه MS جهت باززایی استفاده شد. تیمار ۲ و ۴ که ترکیب هورمونی آن BAP + IBA و TDZ بودند، بهترین محیط جهت باززایی افرا شناخته شد. در ضمن Kerns & Meyer (1986) و Preece و همکاران (۱۹۹۱) در محدوده غلظت ۰/۰۵ تا ۰/۰۱ مولار TDZ موفق به باززایی جوانه از *Acer freemanii* و *Acer saccharinum* شدند. این پژوهش برای تولید برگ و

Archive of SID

www.SID.ir

شاخساره اولیه در غلظت‌های هورمونی مورد استفاده همسو با نتایج Zhao و همکاران (2012) بود که بیشترین درصد باززایی جوانه افرا *Acer freemanii* را در محیط کشت MS، حاوی ۰/۰۲ و ۰/۰۰۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده کردند و همچنین Yan-ni و همکاران (2012) بیشترین درصد باززایی جوانه *Acer negunda* در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۰۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌میزان ۲۲ درصد گزارش کردند.

در تحقیق حاضر با وجود اینکه نتایج مطلوب در باززایی اولیه (۵۰ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۰/۰۰۰۲ میلی گرم بر لیتر TDZ و ۵ میلی گرم بر لیتر BAP به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. بیشتر ریزنمونه‌ها پس از دو هفته، زرد و خشک شدند. برای رشد بهتر تک‌گره‌ها و جلوگیری از خشک شدن آن‌ها، تغییراتی در محیط پایه MS داده شد و مشاهده شد که دوبرابر شدن میزان آهن، از زرد شدن برگ‌های اولیه جلوگیری می‌کند اما شاخه‌زایی ایجاد نشد.

کشت جنین‌های بذری

جنین‌های بذری پس از خارج شدن از پوسته در محیط کشت MS شروع به رشد و نمو کردند و فقط در تیمار شاخه‌زایی ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin شاخه‌زایی صورت گرفت. در پرآوری درختان افرا پژوهشگران، مقادیر متفاوت از هورمون TDZ در محدوده غلظت ۰/۱-۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر مورد آزمایش قرار دادند. درحالی‌که TDZ باعث افزایش سرعت تکثیر می‌شود، غلظت‌های بیشتر از ۱/۹ میکرومولار آن موجب عدم انطباق در مورفولوژی باززایی شاخه‌ها می‌گردد (Huetteman & Preece., 1993). هورمون TDZ در غلظت ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۱ در *Acer freemanii* باعث افزایش شاخه‌زایی می‌شود (Fernandez *et al*., 2000). همچنین گزارش شده است که غلظت بیش از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ باعث تشکیل و رشد کالوس می‌شود و مانع شاخه‌زایی است (Kerns & Meyer.,1986). به‌منظور تحریک شاخه‌ها به ریشه‌زایی، غالبا اعمال پیش‌تیمار محیط کشت بدون هورمون مناسب است، زیرا تجمع فلاونوئیدها به‌وسیله اکسین، منجر به القای تشکیل ریشه شده که این اتفاق در حضور سیتوکینین صورت نمی‌گیرد (Curir *et al*.,1990). ریشه‌زایی ریزقلمه‌های *Acer pseudoplatanus* در محیط بدون هورمون، ۴۰ درصد بوده و با کاربرد ۱۲۳ میکرومولار IBA به‌مدت ۲۴ ساعت به‌میزان ۶۵ درصد افزایش یافته است (Wilhelm.,1999). در مطالعات Yamamoto، (۲۰۰۹) بیشترین میزان ریشه‌زایی *Acer mono var. marmoratum* در محیط کشت ½ MS به‌دست آمد. در ریزازدیادی افرای شبه چناری، شاخه‌های ۳-۲ سانتی‌متری در محیط کشت MS، همراه یا بدون تنظیم‌کننده‌های رشد (به‌همراه ۱۲۳ میکرومولار IBA) به‌طور موفقیت‌آمیزی ریشه‌دار شدند. بر این اساس در این تحقیق ریشه‌زایی در محیط ½MS بدون هورمون به‌دست آمد و نهال‌ها به جیفی‌پات منتقل و سپس به گلدان و خاک منتقل شدند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

در بین تیمارهای هورمونی آزمایش شده، بهترین محیط جهت باززایی حاوی ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. در میان هورمون‌های مصرف شده تیمارهای حاوی ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin عملکرد مناسبی در باززایی از کالوس داشت اما به‌طور کلی اکثر تیمارهای هورمونی استفاده شده بر تولید کالوس‌های جنین‌زا اثرگذار نبودند. همچنین بهترین محیط جهت پرآوری از جنین بذری محیط MS با دو برابر آهن همراه با ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. ریشه‌زایی در محیط MS ½، با دو برابر آهن و بدون هورمون انجام شد. با توجه به اینکه ریزازدیادی گیاه افرا کیکم برای اولین بار انجام شده است جهت بهبود تحقیقات در این زمینه پیشنهادات زیر ارائه می‌گردد:

Archive of SID

www.SID.ir

برای تحقیقات بیشتر و ادامه ریزازدیادی افرا کیکم بهتر است تمرکز بر روی تولید کالوس‌های جنین‌زا باشد.

از سایتوکینین‌های دیگر مانند Zeatin و 2ip با غلظت‌های متفاوت نیز استفاده شود.

از سایر ریزنمونه‌ها و روش‌های نوین تهیه ریزنمونه جهت بهبود کشت بافت و افزایش عملکرد استفاده شود.

منابع مورد استفاده

-Babaeian, M., 2001. First scrutiny *Acer cineracens* ecology in the region of Fars Province. M.Sc. thesis, Shiraz University, Shiraz, Iran, 178pp

-Borhani. A. and Musazadeh. S.A., 2008. Scrutiny tar spot disease on different species of maple in the province Mazandaran. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 12: 88-97

-Cheng, T., 1980. Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques proc. Plant Propagations, 28: 139-155

-Ďurkovič, J., 1996. *In vitro* regeneration of Norway Maple (*Acer platanoides L.*). Biologia Plantarum, 38: 303-307

-Fernandez-Lorenzo, J.L., Iglesias-Díaz, M.L. and Gutiérrez, A., 2000. Micropropagation of a selected rootstock of *Acer palmatum*. In XIVth International Symposium on Horticultural Economics, 5*36*: 347-354

-Fukui, H., Nishimoto, K., Murase I. and Nakamura, M., 1990. Annual changes in responsiveness of shoot tip cultures to cytokinin in *Japanese persimmon*. J. Japan. Hort. Sci., 59: 271-274.

-Huetteman, C.A. and Preece, J.E., 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant cell tissue culture. Plant Cell Tissue Org. 33:105-121.

-Kerns, H.R . and Meyer, M,. 1986. Tissue culture propagation of *Acer freemanii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. HortScience, 21: 1209-12010

-Lattier, J., Touchell, D. and Ranney, T., 2012. Micropropagation of *Acer platanoides* Crimson Sentry. SNA Research Conference, 52: 296-300

- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A Revised medium for rapid growth and bio assays tobacco tissue cultures. physiologia Plantarum, 15: 473-497

-O'Connor, A., Hubstenberger, J., Killough, C., VanLeeuwen, D. and St Hilaire, R., 2007. *In Vitro* propagation of *Acer grandidentatum Nutt*. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, *43: 40-50*

-Sabety, H., 1992. Forests, Trees and Shrubs of Iran. Yazd University Press, Yazd, 890pp–

-Sagheb Talebi, Kh., Sajedi, T., and Yazdian, F., 2004. Take the Forests of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 27pp

-Preece, J., and Huetteman, C. and Roth, P., 1991. Micro-and cutting propagation of silver maple Ii genotype and provenance affect performance. Journal of the American Society for Horticultural Science, 116: 149-155

-Wann, S. and Gates, E., 1993. Micropropagation of mature red maple (*Acer Rubrum L.*). In Proc. Soc. Tree Improv. Conf., 22: 99-105

- Wilhelm, E., 1999. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 57: 57-60

- Zhao, X., Yuan, Z., Yin, Y. and Feng, L., 2012. The Infiuence of thidiazuron on proliferation of *Acer freemanii in vitro*. Acta Horticulture, 937: 143-148

- Yan-Ni, Z., Ya-Ru, D., Li-Huan, Z. and Yuan-Dong, Z., 2012. Effect of plant hormones on callus induction and regeneration of stem segment and leaf from *Acer negundo*. Forest Research, 4: 019

-Yamamoto, S., 2009. *In vitro* plantlet regeneration from winter buds of juvenile seedlings of itayakaede (*Acer mono var. marmoratum f. dissectum*). Bulletin of the Shizuoka Institute of Agriculture and Forestry, 8: 81-86.

Archive of SID

www.SID.ir

Micropropagation of *Acer monospessulanum* through tissue culture

A. Saeedi Heidari [1] and A. Safarnejad[2*]

1-M.Sc., Islamic Azad University of Science and Research Branch, Tehran, I.R.Iran
2*- Corresponding author, Assoc. Prof., Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad, I.R.Iran, Email: Sebre14@yahoo.com

Received: 07.01.2015 Accepted: 17.03.2015

Abstract

Acer is a tree from Aceracea family. Acer is one of the plants in danger of extinction. Problem with the species is rooting of cuttings and seed germination. The purpose of this study was to determine an optimum media for plant regeneration by tissue culture. MS medium supplemented with different concentration of oxin and cytokinin were used for buds regeneration. The best treatment for sterilization was %0.1 mercuric chloride for 3 min., %70 ethanol for 3 min. and NaOCl for 20 min. For regeneration of the cuttings, MS media supplemented with different plant growth regulators were used. The study was carried out based on a completely randomized design with 4 replications. Results showed that MS medium supplemented with 5 mg/l BAP + 0/1 mg/l IBA and 0/0002 mg/l TDZ was the best media for regeneration, Also the best treatment for multiplication was MS media with doubled Fe and 0/005 mg/L TDZ + 0.5 mg/L Kin. Rooting was observed on hormone free ½ MS media with 2 times Fe. Plantlets with acceptable growth and rooting were transferred to Jiffy pot and eventually transferred to soil.

Keywords: *Acer monospessulanu*m, tissue culture, plant hormones.

Archive of SID

www.SID.ir