

## باززایی غیرمستقیم کبکم ترکمنی (*Acer monospessulanum*) در شرایط درون شیشه‌ای

عباس صفرنژاد<sup>۱\*</sup> و هادی درودی<sup>۲</sup>

\*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،

مشهد پست الکترونیک: sebre14@yahoo.com

۲- دکترای جنگل‌داری، بخش تحقیقات کشت بافت، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۵

### چکیده

گونه کبکم یکی از گونه‌های مهم جنس *Acer* از خانواده Aceraceae می‌باشد. زیرگونه turcomanicum در جنگل‌های ناحیه رویشی ایران تورانی به‌عنوان گونه همراه ارس در ارتفاعات استان‌های خراسان رضوی و شمالی پراکنش دارد. سال بذردهی این گونه هر سه سال یکبار است. قوه نامیه بذر آن پایین و تعداد بذرهای رسیده و سالم کم می‌باشد. بذرهای این گونه دارای خواب بوده و قوه نامیه آن پس از طی دوره سرمادهی کاهش می‌یابد. متأسفانه، بسیاری از رویشگاه‌های این گونه تحت تأثیر چرای دام و دخالت‌های انسانی با تخریب زیادی مواجه شده است. به دلیل مشکلات تکثیر جنسی، استفاده از روش‌های غیرجنسی به‌منظور تولید نهال‌های با کیفیت مطلوب می‌تواند در احیاء رویشگاه‌های این گونه بسیار راهگشا باشد. یکی از راه‌های مطمئن تولید نهال، تکثیر غیرجنسی از طریق ریزازدیادی است. به این منظور ریزنمونه‌ها از رویشگاه آن تهیه و باززایی انجام شد. القاء کالوس در محیط‌های هورمونی مختلف انجام و غلظت‌های مختلف هورمونی برای باززایی کالوس بررسی شد. از بین محیط‌های مورد بررسی، باززایی غیرمستقیم از کالوس تنها در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون رشد گیاهی تیدیازورون (TDZ) انجام شد. تعداد، رشد طولی و شادابی ساقه‌چه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون TDZ بررسی شد و تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ با متوسط ۴/۱۶ عدد بیشترین تعداد ساقه‌زایی را داشت. از نظر شادابی و ارتفاع ساقه‌چه‌ها تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشت. به‌طورکلی محیط پایه MS و هورمون TDZ برای باززایی کالوس گونه کبکم ترکمنی مناسب می‌باشد. گیاهچه‌های باززایی شده به‌منظور سازگاری به گلدان منتقل و بعد به خاک انتقال یافتند.

واژه‌های کلیدی: افراکبک، باززایی، کالوس، TDZ.

### مقدمه

(2004). زیرگونه turcomanicum در جنگل‌های ناحیه رویشی ایران تورانی به‌عنوان گونه همراه ارس در ارتفاعات استان‌های خراسان رضوی و شمالی انتشار دارد (Sabeti, 1992). طبق رده‌بندی Sagheb Talebi و همکاران (۲۰۰۴) این گونه جزو گونه‌های در حال انقراض

کبکم ترکمنی با نام علمی *Acer monospessulanum* subsp. turcomanicum یکی از پنج زیرگونه افراکبک می‌باشد که در ایران می‌روید. این گیاه یکی از گونه‌های مهم جنس *Acer* از خانواده Aceraceae است (Mozaffarian, )

(۲۰۱۵) اشاره کرد که در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۰۰۰۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و پنج میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین باززایی مستقیم را داشتند. محیط MS با دو برابر آهن همراه با ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بهترین محیط برای پرآوری از جنین بذری بوده است. ریشه‌زایی در محیط MS 1/2، با دو برابر آهن و بدون هورمون مشاهده شده است. تکثیر غیرجنسی افراکیکم از طریق کشت جنین‌های جنسی توسط Emam و همکاران (۲۰۰۶) مورد بررسی قرار گرفته است. به‌منظور سترون‌سازی از تیمار شستشو در آب جاری و محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد استفاده شده و محیط MS اصلاح شده بهترین محیط به‌منظور استقرار جنین بذرها تشخیص داده شده است. در این رابطه همچنین Emam (۲۰۰۵) امکان ریزازدیادی افراکیکم به‌روش کشت سرشاخه را بررسی کرده و مناسب‌ترین شاخه‌زایی و رشد طولی از جوانه و ریزقلمه در محیط MS دارای غلظت ۱/۴ نیترات با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسکوربیک اسید به‌دست آمده است. تیمارهای مختلف ریشه‌زایی بر شاخه‌های تکثیر یافته اعمال شده ولی نتیجه مثبت نبوده است. همچنین Nasiri (۲۰۰۸) در بررسی تیمارهای مختلف به‌منظور شکستن خواب بذر کیکم گزارش کرده که بذر آن دارای خواب دوگانه است و بهترین شرایط برای جوانه‌زنی بذر این گونه در آزمایشگاه، ضدعفونی سطحی و سرمادهی به‌مدت شش ماه در بستر ماسه می‌باشد. جنین‌زایی سوماتیکی در افرا ژاپنی توسط Vlačínová و Havel (۱۹۹۹) مورد بررسی قرار گرفته است. آنان مؤثرترین ترکیب را بستر MS حاوی ده میکرومول در لیتر BAP همراه با ۰/۱ میکرومول در لیتر 2.4.D و یا پنج میکرومول BAP فاقد 2.4.D عنوان کردند. در ضمن O'Connor و همکاران (۲۰۰۷)، در بررسی امکان ریزازدیادی گونه *Acer grandidentatum* در شرایط درون‌شیشه‌ای بالاترین میزان جوانه‌زنی را در

و در گروه ذخایر طبیعی مدیریت‌یافته قرار گرفته است. این گونه در نواحی شمال‌شرق کشور انتشار دارد و از گرگان، جنگل‌های کنول 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 شاهوارکوه ۲۴۰۰ متری از سطح دریاست (Sabeti, 1992). با وجود بذردهی هرساله، بذردهی فراوان این گونه هر سه سال یکبار اتفاق می‌افتد؛ درعین‌حال، قوه نامیه بذر پایین است؛ ضمناً به‌شدت مورد حمله آفات بذرخوار بوده و پس از رسیدن، در رویشگاه‌های مختلف، ۷۰-۵۰ درصد بذرها پوک و آسیب دیده‌اند. بذر دارای خواب است و قوه نامیه آن پس از طی دوره سرمادهی کمتر نیز می‌شود (Salavati et al., 2013).

از آنجا که کیکم ترکمنی به‌صورت بومی در استان خراسان رضوی و شمالی وجود دارد، از این‌رو با معرفی این گونه زیبا و کم‌نیاز از نظر آب و موادغذایی به‌منظور استفاده در فضای سبز شهری و بین شهری می‌توان به فضای سبز شهری تنوع بیشتری داد. زیرا این گونه مشکلاتی را که بسیاری از گونه‌های وارداتی با آن مواجه هستند مانند حساسیت زیاد به تنش‌های زنده و غیرزنده ندارد. متأسفانه، بسیاری از رویشگاه‌های این گونه تحت تأثیر چرای دام و دخالت‌های انسانی با تخریب زیادی مواجه شده است و به‌دلیل پوسته ضخیم بذر زادآوری جنسی آن پایین می‌باشد. همچنین جمع‌آوری بذر افرا کیکم در طبیعت مشکل می‌باشد (Saeedi-Heidari & Safarnejad, 2015). از این‌رو استفاده از روش‌های غیرجنسی به‌منظور تولید نهال‌های با کیفیت مطلوب می‌تواند در احیاء رویشگاه‌های این گونه بسیار راهگشا باشد. از آنجایی‌که تکثیر این گونه از طریق قلمه و بذر با مشکلات زیادی همراه می‌باشد، یکی از راه‌های مطمئن تولید نهال، تکثیر غیرجنسی از طریق ریزازدیادی می‌باشد.

در مورد ریزازدیادی جنس افرا در کشور تحقیق زیادی انجام نشده است. ازجمله تحقیقات انجام شده می‌توان به تحقیق Saeedi-Heidari و Safarnejad

جمع‌آوری شدند و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه کشت بافت انتقال یافتند. ریزنمونه از بخش‌های مختلف گیاه از جمله جوانه انتهایی و میان‌گره تهیه شد. ابتدا پیش‌تیمارهای ضدعفونی شامل جدا کردن برگ‌های اضافی، قسمت‌های پوسیده و قدیمی و قرار دادن در زیر آب جاری به مدت یک تا دو ساعت به منظور حذف آلودگی‌های سطحی انجام شد. سپس تیمار ضدعفونی مناسب با بررسی روش‌های مختلف ضدعفونی به دست آمد و شامل قارچ‌کش ریدومیل ۰/۵ درصد (ده دقیقه) + کلرید جیوه ۰/۱ درصد (سه دقیقه) + اتانول ۷۰ درصد (سه دقیقه) + هیپوکلریت ۱/۵ درصد کلر فعال (۲۰ دقیقه) بود، سپس به منظور ضدعفونی ریزنمونه‌ها سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل زیر هود لامینار، انجام شد.

تیمارهای هورمونی مورد استفاده به منظور بررسی درصد باززایی ریزنمونه‌ها شامل ۱۲ ترکیب تیماری بود (جدول ۱). تیمارهای مورد ارزیابی بدین نحو بود که از هر ترکیب هورمونی ۲۵ عدد ریزنمونه در شیشه‌های کوچک حاوی ده سی سی محیط MS، کشت شد که پس از حدود چهار هفته و تعیین درصد ریزنمونه‌های آلوده براساس تعداد ریزنمونه‌های باقی‌مانده درصد باززایی در هر ترکیب تیماری تعیین شد.

به منظور بررسی باززایی از کالوس، دو مرحله آزمایش به شرح زیر انجام شد.

آزمایش اول: به منظور بررسی باززایی غیرمستقیم، کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه‌های کشت شده به منظور بررسی باززایی مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که ابتدا آنها را در محیط مناسب برای تکثیر کالوس تکثیر کرده، سپس به منظور بررسی باززایی غیرمستقیم و تولید جنین سوماتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. هر تیمار شامل شش شیشه مربایی و هر شیشه مربایی هم حاوی پنج قطعه کالوس بود. تیمارهای هورمونی مورد استفاده برای باززایی غیرمستقیم در جدول ۲ نشان داده شده است.

محیط کشت DKW به دست آوردند. آنان به این نتیجه رسیده‌اند که DKW می‌تواند برای تکثیر استفاده شود و IAA باعث ریشه‌زایی می‌گردد. همچنین Wilhelm (۱۹۹۹) ریزازدیادی افرا شبه‌چناری از طریق تشکیل شاخساره نابجا با استفاده از Thidiazuron را مورد بررسی قرار داد و بهترین میزان پرآوری را با ۰/۰۴ میکرومولار TDZ و ۰/۱ میکرومولار BA به دست آورد. در پژوهش مذکور شاخه‌های قطع شده با طول دو تا سه سانتی‌متر در محیط کشت MS و همراه یا بدون تنظیم‌کننده‌های رشد پس از انتقال به گلخانه به طور موفقیت‌آمیزی ریشه‌دار شدند. در ریزازدیادی گونه *Acer caudatifolium* توسط Durkovic (۲۰۰۳) برای تکثیر ساقه‌ها از ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در بستر پایه WPM استفاده شد و بیشترین ریشه‌زایی در بستر پایه نیم غلظت WPM همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. در ریزازدیادی افرا شبه‌چناری توسط Latteir و همکاران (۲۰۱۳) از محیط‌های MS، QL و WPM که غلظت‌های مختلف هورمونی به آن افزوده شده بود استفاده شد و بیشترین تعداد ساقه و ارتفاع ساقه در غلظت دو میکرومول BAP به دست آمد. ضمن اینکه بهترین ریشه‌زایی در ده میکرومول هورمون IBA حاصل شد.

هدف از این تحقیق، بررسی باززایی غیرمستقیم یکم ترکمنی و تکثیر انبوه آن در جهت حفظ و احیاء رویشگاه‌های آن، تهیه پروتکل برای نگهداری در شرایط فراسرد و تولید بذر مصنوعی و همچنین استفاده از این گونه ارزشمند و کم‌نیاز در فضای سبز شهری و تنوع بخشی به گونه‌های فضای سبز می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

نمونه افرای مورد مطالعه به منظور انجام کارهای کشت بافت، از رویشگاه و ذخیره‌گاه جنگلی کلاته چنار شهرستان درگز، در فاصله چهار کیلومتری غرب روستای ارباب و ۶۸ کیلومتری شمال غرب شهر درگز در مجاورت مرز ایران و ترکمنستان تهیه شد. سرشاخه‌ها در اواخر فصل بهار

جدول ۱- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به منظور بررسی جوانه‌های افرا در محیط درون شیشه‌ای

شماره	تیمار هورمونی	شماره	تیمار هورمونی
۱	MS	۷	MS + ۰/۱ mg/l IBA + ۳ mg/l Kin
۲	MS+۰/۵ mg/l BAP	۸	MS + ۰/۱ mg/l IBA + ۰/۵ mg/l BAP
۳	MS+۱ mg/l BAP	۹	MS + ۰/۱ mg/l IBA + ۱ mg/l BAP
۴	MS+۲ mg/l BAP	۱۰	MS + ۰/۱ mg/l IBA + ۲ mg/l BAP
۵	MS+۳ mg/l BAP	۱۱	MS + ۰/۱ mg/l IBA + ۳ mg/l BAP
۶	MS+۵ mg/l BAP	۱۲	MS + ۰/۱ mg/l IBA + ۵ mg/l BAP

جدول ۲- ترکیب تیمارهای هورمونی مورد استفاده در جنین‌زایی و تکثیر گونه

شماره	تیمار هورمونی	شماره	تیمار هورمونی
۱	MS+۰/۰۱۲ mg/l BAP	۲۲	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l BAP
۲	MS+۰/۲۲۷ mg/l BAP	۲۳	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ + ۰/۲۵ mg/l BAP
۲	MS+۱/۲۵ mg/l BAP	۲۴	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l BAP
۴	MS+۰/۰۰۲ mg/l TDZ	۲۵	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ + ۰/۲۵ mg/l BAP
۵	MS+۰/۰۰۵ mg/l TDZ	۲۶	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l BAP
۶	MS+۰/۰۱ mg/l TDZ	۲۷	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ + ۳ mg/l BAP
۷	MS+۰/۵ mg/l Kin	۲۸	MS + ۰/۱ mg/l TDZ + ۳ mg/l BAP
۸	MS+ ۱ mg/l Kin	۲۹	MS + ۰/۰۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l Kin
۹	MS+۰/۲۲۷ mg/l BAP + ۰/۱ mg/l IBA	۳۰	MS + ۰/۰۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l Kin
۱۰	MS+۰/۰۱۲ mg/l BAP + ۰/۱ mg/l IBA	۳۱	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l Kin
۱۱	MS+۰/۰۱۲ mg/l BAP + ۰/۰۹۳ mg/l NAA	۳۱	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۲۵ mg/l Kin
۱۲	MS+ ۳ mg/l BAP + ۰/۱ mg/l 2-4-D	۳۳	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l Kin
۱۳	MS+ ۳ mg/l BAP + ۰/۵ mg/l 2-4-D	۳۴	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l Kin
۱۴	MS+ ۳ mg/l BAP + ۱ mg/l 2-4-D	۳۵	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ + ۰/۲۵ mg/l Kin
۱۵	MS + ۳ mg/l BAP + ۰/۵ mg/l 2-4-D + gazein ٪۱	۳۶	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l Kin
۱۶	MS + ۳ mg/l BAP + ۰/۱ mg/l 2-4-D + gazein ٪۱	۳۷	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ + ۰/۲۵ mg/l Kin
۱۷	MS + ۳ mg/l BAP + ۱ mg/l 2-4-D + gazein ٪۱	۳۸	MS + ۰/۵ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l IBA
۱۸	MS + ۰/۰۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l BAP	۳۹	MS + ۱ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l IBA
۱۹	MS + ۰/۰۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l BAP	۴۰	MS + ۳ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l IBA
۲۰	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l BAP	۴۱	MS + ۰/۰۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l Kin + ۰/۱ mg/l BAP
۲۱	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۲۵ mg/l BAP	۴۲	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۵ mg/l Kin + ۰/۵ mg/l BAP

آزمایش دوم:

با توجه به عدم توفیق در آزمایش اول، به منظور بررسی باززایی غیرمستقیم کالوس‌های حاصل از مرحله قبل به محیط‌های با ترکیبات مختلف هورمونی منتقل شدند (جدول ۳).  
به منظور بررسی تعداد ساقه‌چه و رشد ساقه‌چه‌های ایجاد

شده، کالوس‌های باززایی شده به محیط‌های با ترکیبات هورمونی مختلف منتقل شدند و از نظر تعداد ساقه و رشد طولی و شادابی مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد شادابی سه کلاس شادابی در نظر گرفته شد که شامل ضعیف، متوسط و خوب بود و به ترتیب با کدهای یک تا سه تعیین شدند.

جدول ۳- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به منظور بررسی باززایی در آزمایش دوم

شماره	تیمار هورمونی	شماره	تیمار هورمونی
۱	MS + ۰/۰۰۰۱ mg/l TDZ	۶	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ
۲	MS + ۰/۰۰۰۵ mg/l TDZ	۷	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ
۳	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ	۸	MS + ۰/۰۵ mg/l TDZ
۴	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ	۹	MS + ۰/۱ mg/l TDZ
۵	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ		

جدول ۴- ترکیب هورمونی مورد استفاده برای بررسی رشد و وضعیت ساقه‌چه‌های باززایی شده

ردیف	ترکیب هورمونی مورد استفاده	ردیف	ترکیب هورمونی مورد استفاده
۱	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ	۴	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ
۲	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ	۵	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ
۳	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ	۶	MS + ۰/۰۵ mg/l TDZ

دو برابر آهن محیط MS استفاده شد. گیاهچه‌ها به منظور انتقال به شرایط خارج شیشه‌ای باید به تدریج با شرایط گلخانه سازگار شوند که با گذاشتن لیوان‌های شفاف پلاستیکی روی گلدان‌ها و کاهش تدریجی رطوبت اطراف گیاهچه و افزایش تدریجی شدت نور انجام شد.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۰ تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و پس از تعیین همگنی و نرمال بودن داده‌ها، برای مقایسات کلی از آزمون تجزیه واریانس و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

کلیه محیط‌های تهیه شده دارای ۳٪ ساکارز و ۰/۸٪ آگار بودند. در ضمن pH محیط‌ها با استفاده از NaOH و HCl در ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. به منظور سترون کردن محیط‌های تهیه شده از اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر و زمان ۱۵ دقیقه استفاده شد. کشت‌ها در اتاق رشد با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی که با استفاده از لامپ‌های فلورسنت سرد تأمین می‌شد، نگهداری شدند. واکاشت‌ها نیز هر چهار هفته یکبار انجام شد. البته در مورد میزان آهن مورد استفاده به علت زرد شدن گیاهچه‌ها در مرحله باززایی برای گیاهچه‌های باززایی شده از کالوس نیز از

## نتایج

## کالوس‌زایی و باززایی

نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر درصد کالوس‌زایی بین تیمارهای مختلف مورد بررسی وجود داشت (جدول ۵). نتایج بررسی میانگین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف با افزایش غلظت هورمون‌های مورد استفاده میزان کالوس‌زایی افزایش یافت (جدول ۶). درصد باززایی ریزنمونه‌ها با

تجزیه واریانس بررسی شد و تفاوت معنی‌داری از این نظر بین ترکیب‌های هورمونی مختلف وجود داشت (جدول ۵). در بین تیمارهای باززایی مورد استفاده تیمارهای ۶، ۷ و ۱۲ (یعنی  $5 \text{ mg/l BAP} + 1 \text{ mg/l IBA} + 0 \text{ mg/l Kin}$ ،  $3 \text{ MS} + 1 \text{ mg/l IBA} + 5 \text{ mg/l BAP}$  و  $3 \text{ MS} + 1 \text{ mg/l IBA} + 5 \text{ mg/l BAP}$ ) بیشترین درصد باززایی را داشتند. البته سایر ترکیب تیمارها از درصد باززایی قابل توجهی برخوردار نبودند (جدول ۶).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس درصد باززایی و کالوس‌زایی ریزنمونه‌های افرا در محیط‌های مختلف

sig.	F	میانگین مربعات	df	
۰/۰۰۰***	۷/۳۲۳	۳۵۳/۷۷۹	۱۱	درصد باززایی
۰/۰۰۱***	۴/۶۹۷	۳۸۸/۴۰۲	۱۱	درصد کالوس‌زایی

\*\*\*: در سطح احتمال ۹۹ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

جدول ۶- مقایسه میانگین درصد باززایی و کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها تحت تأثیر ترکیب‌های هورمونی مختلف

درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی ریزنمونه	تیمار هورمونی	
۰/۰ d	۰/۰ b	MS	۱
$22/2 \pm 6/41$ bc	۰/۰ b	$MS + 0/5 \text{ mg/l BAP}$	۲
$14/2 \pm 4/07$ cd	۰/۰ b	$MS + 1 \text{ mg/l BAP}$	۳
$18/2 \pm 1/79$ c	$9 \pm 3$ b	$MS + 2 \text{ mg/l BAP}$	۴
$14/3 \pm 1/85$ cd	$7/1 \pm 4/13$ b	$MS + 3 \text{ mg/l BAP}$	۵
$36/4 \pm 4/73$ ab	$26/3 \pm 5/03$ a	$MS + 5 \text{ mg/l BAP}$	۶
$25 \pm 4/62$ abc	$25 \pm 7/21$ a	$MS + 0/1 \text{ mg/l IBA} + 2 \text{ mg/l Kin}$	۷
$25 \pm 3/46$ abc	۰/۰ b	$MS + 0/1 \text{ mg/l IBA} + 0/5 \text{ mg/l BAP}$	۸
$28 \pm 2/52$ abc	$4/73 \pm 2/37$ b	$MS + 0/1 \text{ mg/l IBA} + 1 \text{ mg/l BAP}$	۹
$27/3 \pm 10/51$ abc	$9/1 \pm 5/25$ b	$MS + 0/1 \text{ mg/l IBA} + 2 \text{ mg/l BAP}$	۱۰
$35/7 \pm 8/26$ ab	$9/47 \pm 6/26$ b	$MS + 0/1 \text{ mg/l IBA} + 3 \text{ mg/l BAP}$	۱۱
$41/37 \pm 5/08$ a	$29/2 \pm 4/17$ a	$MS + 0/1 \text{ mg/l IBA} + 5 \text{ mg/l BAP}$	۱۲

حروف مختلف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ می‌باشد.

مورد آزمایش قرار گرفت، فقط در تیمار ۳۱، (۰/۰۰۱) میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (Kin)

نتایج آزمایش اول در مورد باززایی از کالوس نشان داد که در ۴۲ تیمار هورمونی که به‌منظور باززایی از کالوس

سه هفته علائم باززایی در تیمار ۷ و ۸ جدول یعنی غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ هورمون TDZ مشاهده شد که در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در حدود ۱۰ درصد نمونه‌ها و در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ حدود ۲۰ درصد نمونه‌ها جنین‌زایی کردند.

#### سایر خصوصیات

نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که ترکیب‌های هورمونی باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در تعداد ساقه گیاهچه‌ها شدند (جدول ۷). اما بر رشد ارتفاعی و شادابی گیاهچه‌ها تأثیر معنی‌داری نداشتند (جدول ۷ و ۸).

باززایی از کالوس انجام شد. اما برگ‌های گیاهچه‌های ایجاد شده دچار عارضه شیشه‌ای شدن شدند و حتی با کاهش میزان سیتوکینین محیط و همچنین افزایش میزان آگار محیط نیز بهبود نیافت و بعد از یک ماه برگ‌ها قهوه‌ای شدند و گیاهچه از بین رفت.

در آزمایش دوم نیز ابتدا هیچ گونه باززایی در محیط‌های فوق انجام نشد. سپس کالوس‌ها به محیط حاوی ۱ MS + mg/l BAP منتقل شدند و برای حدود دو ماه (دو نوبت واگشت) در این محیط باقی ماندند. پس از دو ماه به محیط‌های حاوی ۰/۰۰۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ منتقل شدند (محیط‌های ۳ تا ۹ جدول). پس از حدود

جدول ۷- آزمون تجزیه واریانس تعداد ساقه‌چه و ارتفاع ساقه‌چه تحت تأثیر ترکیب‌های هورمونی مختلف

sig.	F	میانگین مربعات	df	
۰/۰۲۴*	۳/۱۷۹	۶/۸۱۰	۵	تعداد ساقه
۰/۵۷۵ ns	۰/۷۷۹	۰/۱۱۸	۵	ارتفاع ساقه

\*: در سطح احتمال ۹۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

جدول ۸- بررسی وضعیت شادابی ساقه‌چه‌ها تحت تأثیر ترکیب‌های هورمونی با استفاده از آزمون کروسکال والیس

Sig.	df	Chi- Square	
۰/۱۳۹ ns	۵	۸/۳۲۰	شادابی

NS: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

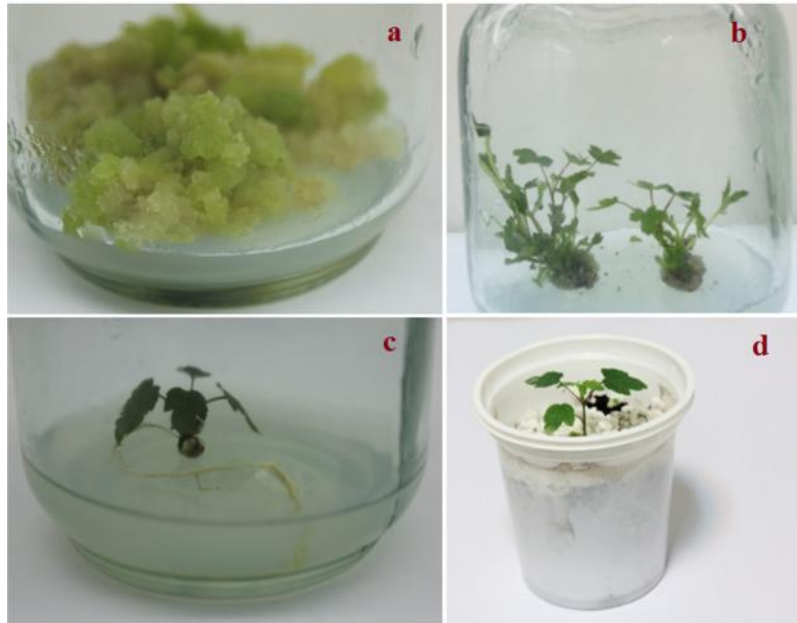
جدول ۹- نتایج بررسی وضعیت گیاهچه‌های باززایی شده پس از افزودن محیط کشت به آن

ردیف	ترکیب محیط پایه	تعداد ساقه	ارتفاع (Cm)	وضعیت شادابی
۱	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ	۱/۲۵ ± ۰/۲۵ b	۰/۶۷ ± ۰/۲۲ ns	۱/۵ ± ۰/۵ ns
۲	MS + ۰/۰۰۵ mg/l TDZ	۱ ± ۰ b	۰/۷ ± ۰/۱۷ ns	۱ ± ۰ ns
۳	MS + ۰/۰۱ mg/l TDZ	۱/۵ ± ۰/۲۹ b	۰/۸ ± ۰/۲۵ ns	۲/۵ ± ۰/۲۹ ns
۴	MS + ۰/۰۵ mg/l TDZ	۲ ± ۰/۶۹ b	۰/۷۳ ± ۰/۱۵ ns	۲/۲۹ ± ۰/۲۹ ns
۵	MS + ۰/۱ mg/l TDZ	۱/۸۳ ± ۰/۴۸ b	۰/۸۱ ± ۰/۱۹ ns	۲ ± ۰/۲۶ ns
۶	MS + ۰/۵ mg/l TDZ	۴/۱۶ ± ۰/۸۷ a	۱/۰۸ ± ۰/۵ ns	۲/۱۷ ± ۰/۴ ns

حروف مختلف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ می‌باشد.

فاقد هورمون، اقدام به ریشه‌زایی کردند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از انتقال به شرایط خارج از شیشه در بستر کوکویت - پیت‌ماس به‌خوبی مستقر شده و با شرایط محیط سازگار شدند.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد (جدول ۹) که در تیمار ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ بیشترین تعداد ساقه‌زایی وجود داشته و سایر تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌داری از این نظر با هم نداشتند. گیاهچه‌های تولید شده در محیط MS



شکل ۱- مراحل مختلف ریزازدیادی افرای کیکم. کالوس (a)، گیاهچه باززایی شده (b)، گیاهچه ریشه‌دار (c) و گیاهچه منتقل شده به بستر پیت‌ماس- پرلایت به‌منظور سازگاری به محیط (d)

بوده و ریزنمونه‌ها برای باززایی به مقادیر بیشتر از این هورمون نیاز دارند که با افزودن به محیط تأمین شد. در مورد گونه عناب (*Ziziphus jujube*) مقدار دو میلی‌گرم بر لیتر BAP (Safarnejad, 2015) و در مورد جنین بذری کیکم ترکمنی مقدار پنج میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین میزان باززایی را به‌خود اختصاص دادند (Saeedi Heidari & Safarnejad, 2015).

در این تحقیق، ریزنمونه‌ها پس از مدتی زرد و رنگ‌پریده شدند که برای رشد بهتر تک‌گره‌ها و جلوگیری از خشک شدن آنها، تغییراتی در محیط پایه MS انجام شد و با دو برابر کردن میزان آهن، زرد شدن برگ‌های اولیه کاهش یافت. همسو با نتایج این تحقیق Bonga و Von Aderkas (۱۹۹۲) در مورد تعدادی از گونه‌های درختی نیز نتیجه گرفته‌اند که تیمار سیتوکینین به‌همراه اکسین در غلظت‌های

## بحث

نقش و اثر BAP در شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخه‌های جدید است. در این مورد ذکر شده که BAP جزو ترکیبات آمینو می‌باشد و این ترکیبات می‌توانند باعث افزایش تقسیم سلولی، تمایز، رشد و توسعه ساقه‌های چندتایی در شرایط درون شیشه شوند (Sotiropoulos *et al.*, 2005). در این زمینه Tomas و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش کردند که سیتوکینین‌ها از آدنین مشتق شده‌اند و فرایند ریخت‌زایی را به‌وسیله ایجاد دو اثر فوری تحریک سنتز DNA و افزایش تقسیم سلولی بر سلول‌های تمایز نیافته تسریع می‌کنند. در این تحقیق باززایی در مقادیر نسبتاً بالای سیتوکینین یعنی مقادیر ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و کینتین انجام شد. به‌نظر می‌رسد مقادیر این هورمون‌ها در بافت گیاه برای تحریک شاخه‌زایی کم



کالوس‌دهی تا شکل‌گیری جنین سوماتیک را به‌دنبال دارد (Mroginski *et al.*, 2004 و Yucesan *et al.*, 2007). هورمون TDZ فعال‌ترین ماده شبه‌سیتوکینین است و تأثیر آن بر تحریک مناسب ریزنمونه‌ها به اندام‌زایی، شاخه‌زایی، کالوس‌دهی و جوانه‌زایی نابجا در بسیاری تحقیقات دیگر نیز بیان شده است (Husain *et al.*, 2007, Gallo-Meagher *et al.*, 2000, Mroginski *et al.*, 2004, Sujatha *et al.*, 2007). هورمون TDZ نسبت به سیتوکینین‌های داخلی گیاه کمتر به آزیم‌های تخریبی گیاه حساس است، همچنین در غلظت‌های پایین‌تر از دیگر سیتوکینین‌ها فعال‌تر است (Mok *et al.*, 1987). در ضمن هورمون TDZ محرک سنتز و انباشتگی بازهای پورین است و متابولیسم سیتوکینین‌ها را تغییر داده و موجب افزایش سطح سیتوکینین درونی به‌وسیله بازدارندگی عملکرد سیتوکینین اکسیداز خواهد شد (Murthy *et al.*, 1998). با توجه به این نتایج می‌توان گفت که وجود هورمون رشد TDZ در محیط کشت توانسته است تعادل مناسبی بین میزان اکسین و سیتوکینین ایجاد کند (Neto *et al.*, 2003, Radhika *et al.*, 2006). ایجاد شرایط رشدی بهینه می‌تواند به خصوصیت ویژه TDZ برگردد. اگرچه این هورمون در گروه سیتوکینین‌ها قرار می‌گیرد، ولی یکی از ویژگی‌های منحصر به‌فرد آن بروز همزمان اثر اکسین‌ها و سیتوکینین‌هاست. این در حالی است که از نظر ساختاری کاملاً متفاوت از این گروه از تنظیم‌کننده‌ها می‌باشد (Huetteman & Preece, 1993).

نتایج بررسی تعداد ساقه‌چه تولید شده تحت تأثیر مقادیر مختلف هورمون TDZ نشان داد که در بالاترین میزان هورمون TDZ بیشترین تعداد ساقه تولیدی را از خود نشان داد. البته شادابی و ارتفاع ساقه‌های تولیدی تفاوت معنی‌داری از خود نشان ندادند. یکی از نقش‌هایی که برای هورمون TDZ عنوان شده، القاء و تحریک شاخه‌زایی می‌باشد. توانایی تنظیم‌کنندگی مورفولوژی توسط هورمون TDZ به کاربرد آن در کشت گیاه، اندام و سلول برای بهبود دستورات عمل‌های باززایی منجر شده است. عنوان شده که TDZ باعث القاء جوانه‌زایی در بسیاری از گیاهان می‌شود.

ضعیف در ایجاد شاخه‌های نابجا، به‌خصوص در آغاز شاخه‌زایی مؤثر بوده است. همانطور که در قسمت نتایج مشاهده شد بیشترین میزان کالوس‌زایی در مقادیر نسبتاً بالای BAP رخ داد که در همین رابطه نیز ذکر شده است که مهمترین سیتوکینین به‌منظور تولید کالوس، BAP می‌باشد که در غلظت‌های ۰/۵ تا پنج میکرومولار برای تولید کالوس استفاده شده است (Sayed Tabatabaei & Omid, 2009).

ازجمله عوامل مؤثر در تولید کالوس، ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع کربوهیدرات، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه و شرایط محیطی می‌باشد. نتایج نشان داده که وابستگی خاص القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب‌ناپذیر و کلی است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند و در هر گونه و یا ژنوتیپ ممکن است نسبت اکسین و سیتوکینین مورد نیاز برای القاء ساقه یا ریشه و یا کالوس متفاوت باشد (Han *et al.*, 2011). میزان تولید کالوس به ترکیب هورمون‌های رشد به‌کار رفته در محیط کشت بستگی دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین یک فاکتور مورفوژنتیکی تعیین‌کننده و مهم می‌باشد (Abbasi *et al.*, 2007).

به‌طور کلی کنترل فرایندهای تمایزیابی به حضور اکسین و سیتوکینین بستگی دارد و توازن بین آنها تولید اندام‌هوایی و ریشه‌ها را از کالوس سبب می‌شود. گرچه میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی به‌شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (Bhaskaran & Smith, 1990).

در این مطالعه باززایی غیرمستقیم انجام شده در محیط‌های حاوی هورمون TDZ مشاهده شد. در این رابطه عنوان شده است که به‌نظر می‌رسد نوع سیتوکینین به‌کار رفته در محیط کشت در میزان باززایی و قدرت رشدی گیاه باززا شده بسیار مهم است و از اساسی‌ترین عوامل مؤثر بر میزان موفقیت در کشت بافت می‌باشد (Madani *et al.*, 2013).

کاربرد هورمون TDZ با توجه به نوع گیاه، نوع ریزنمونه و غلظت به‌کار برده شده اثرهای متفاوتی از تحریک به

- of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14: 170-174.
- Gallo-Meagher, M., English, R.G. and Abouzid, A., 2000. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36: 37-40.
  - Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L., and Wei, Y. H., 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10: 8984-9000
  - Han, Y., Jin, X., Wu, F. and Zhang, G., 2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *JZUS*, 12(5): 399-407.
  - Huetteman, C. A. and Preece, J.E., 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 33(2): 105-119.
  - Husain, M.K., Anis, M., and Shahzad, A., 2007. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43: 59-64.
  - Latteir, J.D., Touchell, D.H., Ranney, T.G. and Smith, J.C., 2013. Micropropagation and polyploidy induction of *Acer platanoides* Crimson sentry. *Journal of Environment and Horticulture* , 31:246-252.
  - Madani, G., Ghobadi, S., Seyed Tabatabaei, B.E., Talebi, M. and Yamchi, A., 2013. Effect of plant growth regulators and explant types on regeneration and micropropagation of a commercial strawberry cultivar (*Fragaria × ananassa* cv. Selva). *Journal of Science and Technology Greenhouse Culture*, 15(4): 111 – 121.
  - Mok, M. C., Mok, D., Turner, J. and Mujer, C., 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, 22:1194-1197.
  - Mozaffarian, V., 2004. Trees and shrubs of Iran, Res Inst of forest and rangeland, Tehran, 1003 pp.
  - Mroginski, E., Rey, H.Y., Gonzalez, A.M. and Mroginski, L.A., 2004. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulators*, 23: 129-134.
  - Murthy, B., Murch, S. and Saxena, P. K., 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 34:267-275.
  - Nasiri, M., 2008. Investigation of suitable seed germination enhancement and breaking seed dormancy treatment of Montpellier maple (*Acer*

ضمن اینکه TDZ نقش مهمی در ریختزایی دارد و غلظت‌های پایین آن باعث تکثیر جوانه‌های جانبی می‌شود، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر آن باعث توسعه ساقه‌های نابه‌جا می‌شود (Guo *et al.*, 2011). هورمون TDZ تحت تأثیر یک‌سری از فرایندهای زیستی در سلول‌ها ایجاد می‌شوند یا افزایش می‌یابند اما نحوه عملکرد آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است. با این حال، گزارش‌های دیگر نشان داده‌اند که TDZ می‌تواند تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی گیاه را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم تعدیل کند و باعث ایجاد واکنش‌هایی در سلول یا بافت شود که برای تقسیم یا زادآوری ضروری می‌باشد. دیگر عواملی که رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند، عبارتند از: تنظیم‌غشای سلولی، سطوح انرژی، جذب، انتقال و تجمع عناصر غذایی (Guo *et al.*, 2011). به‌طور کلی، به‌منظور باززایی از کالوس گونه افراکیکم ترکمنی محیط پایه MS حاوی غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ مناسب می‌باشد و گیاهچه‌های تولیدشده از شرایط مناسبی از نظر رشد و وضعیت شادابی برخوردارند.

## References

- Abbasi, B., Saxena, P. K., Murch, S. J. and Liu, C.Z., 2007. Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43: 481-492.
- Bhaskaran, S. and Smith, R.H. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, 30: 1329- 1336.
- Bonga, J. M. and von Aderkas, P., 1992. Clonal Propagation. In: "*In vitro* Culture of Trees", (Eds.): Bonga, J. M. and von Aderkas, P., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, PP. 76-104.
- Durkovic, J., 2003. Regeneration of *Acer caudatifolium* Hayata plantlets from juvenile explants. *Plant Cell Report*, 21:1060-1064.
- Emam, M., 2005: Micropropagation of *Acer cinerascens* by shoot tip culture. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 13: 37- 51.
- Emam, M., Shahrzad, Sh., Naraghi, T.S., Khanhasani, M. and Hamzepoor, Y., 2006. Regeneration of *Acer cinerascens* through embryo culture. *Iranian Journal*

- sensitivity of seeds in *Acer monspessulanum* L. Journal of Forest and Wood Products, 66: 293- 304.
- Sayed Tabatabaei, B.E. and Omid, M., 2009. Plant Cell and Tissue Culture. University of Tehran Press. Tehran. (in persian). 368pp.
  - Sotiropoulos, T.E., Mouhtaridou, G.N., Thomidis, T., Tsirakoglou, V., Dimassi, K.N. and Therios, I.N., 2005. Effects of different N-sources on growth, nutritional status, chlorophyll content, and photosynthetic parameters of shoots of the apple rootstock MM 106 cultured *In vitro*. Biologia Plantarum, 49: 2. 297-299.
  - Sujatha, G. and Ranjitha Kumari, B.D., 2007. High-frequency shoots multiplication in *Artemisia vulgaris* L. using thidiazuron. Plant Biotechnology Report, 1: 149-154.
  - Tomas, W., Motyka, V., Strnad, M. and Schmulling, T., 2001. Regulation of plant growth by cytokinins. Journal of Horticultural Science, 6: 36-39.
  - Vlačínová, H. and Havel, L., 1999. Continuous somatic embryogenesis in Japanese Maple (*Acer palmatum* Thunb). Journal of Plant Physiology, 154:212-218.
  - 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.
  - Yucesan, B., Turker, A.U., and Gurel, E., 2007. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 91: 243-250.
  - *monspessulanum* L.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 16: 94-105.
  - Neto, V.B.P., Mota, T.R. and Otoni, W.C., 2003. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixaorellana*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 75: 159-167.
  - O'Connor, A., Hubstenberger, J., Killough, C., VanLeeuwen, D. and St Hilaire, R., 2007. *In vitro* propagation of *Acer grandidentatum* Nutt. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 43: 40-50.
  - Radhika, K., Sujatha, M. and Rao, N, T., 2006. Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. Biologia Plantarum, 50: 174-179
  - Sabeti, H., 1992. Forests, Trees and Shrubs of Iran. Yazd University Press, Yazd, 890pp .
  - Saeedi Heidari, A. and Safarnejad, A., 2015. Micropropagation of *Acer monspessulanum* through tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23: 237-246.
  - Safarnejad, A., 2015. Effects of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Ziziphus jujube*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(1): 40 – 48.
  - Sagheb Talebi, Kh., Sajedi, T., and Yazdian, F., 2004. Take the Forests of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 270pp.
  - Salavati, Gh., Payamnoor, V., Kavooosi, M.R. and Ali-Arab, A., 2013. Storage behavior and desiccation

## Indirect regeneration of *Acer monosperulatum* by *in vitro* techniques

A. Safarnejad<sup>1\*</sup> and H. Darroudi<sup>2</sup>

1\*- Corresponding author, Assoc. Prof., Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R. Iran. Email: Sebre14@yahoo.com

2- PhD, Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R. Iran

Received: 14.03.2016 Accepted: 25.06.2016

### Abstract

*Acer monosperulatum* is an important species of the genus *Acer* from Aceraceae family. Turcamanicum subspecies spreads in Irano-Turanian region as associated plant of juniper forests in highlands of Razavi Khorasan province and northern part of the province. Its mast year is every three years, germination rate of seeds and number of healthy matured seeds is low. Also, the seeds have dormancy period and their germination percentage is decreased after chilling periods. Unfortunately, most of the species habitats are under intense grazing and human intervention effects, so that the species has been encountered with severe destruction. Due to sexual reproduction problems, application of vegetative propagation methods could be advantageous in high quality seedling production and reclamation of the habitats. One of seedling production methods is propagation using *in vitro* techniques. For this purpose, explants were collected from their natural habitats, and their regeneration was assessed in different hormonal treatments. Embryogenesis percentage in different hormonal treatments was investigated. Applying different hormonal treatments, callus regeneration was observed only in 0.1 and 0.5 mg/l of TDZ hormone concentration. Shoot number, shoot growth and shoot vigourity were affected by different concentrations of TDZ hormones. MS media supplemented by 0.5 mg/l TDZ had the highest shoot production. But vigourity and shoot length were not significantly different by utilizing different hormonal treatments. Finally, MS basal media and TDZ hormone are suitable for regeneration from callus in the valuable tree species.

**Key words:** *Acer monosperulatum*, callus, regeneration, TDZ.