ریزازدیادی گونه کیکم (*Acer cinerasens*) از طریق کشت سرشاخه

میترا امام[1]

چکیده

درخت کیکم (*Acer cinerasens*)، یکی از گونه‌های مهم و با ارزش جنس افرا (*Acer*) است که در ناحیه رویشی زاگرس رشد می‌کند. مشکلات متعدد ازدیاد آن از طریق روشهای معمول تکثیر به‌ویژه ریشه‌زایی سخت قلمه‌های درختان بالغ افرا، ما را به انجام این تحقیق رهنمون ساخت. در پژوهش حاضر، امکان ریزازدیادی درخت کیکم به روش کشت سرشاخه‌ای (جوانه انتهایی و ریزقلمه: جوانه سبز شده از قلمه‌های شاخه درخت بالغ)، بررسی شد. ابتدا نمونه‌ها از پایه‌های برگزیده در رویشگاههای طبیعی گیاه واقع در جنگلهای منطقه سرچهان شیراز و قلاجه کرمانشاه در فصول مختلف سال، برداشت شد و پس از سترون‌سازی با تیمارهای متفاوت، در محیط‌های کشت MS و DKW مستقر شدند. مناسب‌ترین شاخه‌زایی و رشد طولی از جوانه و ریزقلمه در محیط MS دارای غلظت ۱/٤ نیترات) با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلیگرم در لیتر 2ip و ۰/۱ میلیگرم در لیترکینتین و ۰/۰۵ میلیگرم در لیتر TDZ و ۰/۰۱ میلیگرم در لیتر IBA و ۰/۲۵ میلیگرم در لیتر GA و آسکوربیک اسید ۱۰۰ میلیگرم در لیتر بدست آمد. تیمارهای مختلف ریشه‌زایی بر شاخه‌های تکثیر یافته اعمال شد، ولی نتیجه آن مثبت نبود.

واژه‌های کلیدی: کیکم، کشت سرشاخه، جوانهٔ انتهایی و ریزقلمه.

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵

E-mail: memam@rifr-ac.ir

مقدمه

گونه کیکم (*Acer cinerasens*) از راسته ساپنتال، تیره افرا (Aceraceae) جنس افرا (*Acer*) است. این گیاه بومی جنگلهای لرستان، کردستان، کرمانشاه، فارس و چهارمحال و بختیاری است. چوب این درخت مصارف صنعتی و زینتی دارد. در صنعت برای تهیه چوب سبک و از نظر زینتی در درختکاریهای حواشی خیابانها و در باغبانی برای کاشت در باغهای کوچک آفتابگیر و خاکهای فقیر استفاده می‌گردد. در مصارف روستایی از آن برای پوشش خانه‌ها و تهیه لوازم آشپزخانه و از برگ آن برای تعلیف دام بهره برداری می‌شود. مشکلات تکثیرجنسی گیاه از طریق بذر عبارت است از چرای مفرط و بد شکلی توده‌های جنگلی که سبب ایجاد بذرهای نارس، ناسالم و آفت زده با قوه نامیه نامناسب و در نتیجه تمایل شدید این گونه به تولید میوه‌های پارتنوکارپیک و بذرهای با نیمبرهای خالی گشته و فقدان پوشش سخت اسکلرانشیمی آن نیز از دلایل کمی زادآوری گونه مزبور می‌باشد. از طرفی بذرهای افرا به دلیل خشک شدن سریع قادر به زنده‌مانی در طولانی مدت نبوده و این مشکلات، جنگلکاران را به تکثیر غیرجنسی گونه مزبور متمایل نموده است. در مورد بیشتر گونه‌های سخت چوب نظیر افرا به دلیل دوره طولانی جوانی و عدم گلدهی مناسب و نیز ریشه‌دهی مشکل قلمه‌ها به ریزازدیادی آنها توجه خاص شده است. در ایران بر روی کیکم تنها مطالعات تاکسونومیکی صورت گرفته و نام آن در فهرست گیاهان ناحیه رویشی زاگرس آمده و هیچ‌گونه بررسی بوم شناختی و جنگل شناختی اختصاصی در مورد آن انجام نشده و در زمینه کشت بافت گونه‌های مختلف افرا نیز تحقیقی گزارش نشده است (بابایان، ۱۳۸۰). مروری بر گزارشهای موفق ریزازدیادی گونه‌های مختلف جنس افرا به قرار زیر بود: Chalupa (۱۹۸۷) نتیجه گرفت که در مورد بعضی از مخروطیان و تعداد کمی از جنسهای درختان سخت چوب نظیر *Acer* و *Fagus*، ریزازدیادی با ریزنمونه‌های گرفته شده از درختان بالغ با مشکل روبرو است. Withers (۱۹۷۶) بر روی کشت

سوسپانسیون سلولی *Acer pseudoplatanus* تحقیق نمود. Rohr (۱۹۸۵) درختان بالغ افرا را با استفاده از تنه جوشها به عنوان ریزنمونه‌های اولیه تکثیر نمود و این سرشاخه‌ها بر محیط MS با ۱/۳ غلظت رشد کرده و ریشه دادند. Wright و Northcote (۱۹۷۲) از کالوسهای کشت شده *Acer* بر محیط واجد غلظت کم کینتین ریشه‌های کوتاه بدست آوردند. Cheng (۱۹۷۸) در تحقیقی در زمینه کشت بافت *Acer platanoides* دریافت که کشت سرشاخه‌ها بر محیط MS[1] تغییر یافته در حضور IBA[2] و BA[3] بعد از ٦ هفته شاخه‌های متعدد را تشکیل می‌دهد. Chalupa (۱۹۸۳) و Rohr (۱۹۸۵) از کشت سرشاخه‌های نهالهای بذری و قطعات کوتاه گره‌ای این گونه بر محیط MS تغییر یافته و MCM[4] به همراه سیتوکنینها تکثیر شاخه را انجام دادند و بعد شاخه‌های با طول ۱/۵ تا ۳ سانتیمتر را بر محیط MCM با ۱/۲ غلظت ریشه‌دار نمودند. Mcclelland وهمکاران (۱۹۹۰) برتشکیل ریشه در ریزقلمه *A. rubrum* در شرایط درون و بیرون شیشه کار کردند و اعلام نمودند که ریشه‌ها در درون شیشه سلولهای پوششی طویلتر و سیستمهای آوندی توسعه یافته‌تری داشته‌اند. با توجه به مشکلات متعددی که تکثیر گونه کیکم از طریق روشهای معمول قلمه زنی و بذر داشت، در این تحقیق امکان ریزازدیادی گونه کیکم از طریق کشت سرشاخه درخت بالغ و نیز ریزقلمه آن مورد بررسی قرار گرفت.

1- Murashige & Skoog medium.
2- Indole butyric acid
3- 6- Benzylaminopurine
4- Mc cown Woody Plant Medium

مواد و روشها

دو پایه بالغ درخت کیکم (در حدود ۵۰ سال سن) در شیراز و کرمانشاه به‌عنوان پایه مادری انتخاب، علامت گذاری و سرشاخه‌های آنها به‌طور مجزا برداشت و به روش زیر سترون گردید:

ابتدا پیش تیمار سترون سازی شامل برس‌کشی با مایع ظرفشویی و محلول اتانل ۷۰ درصد، قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ٦۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد، پوسته برداری از نمونه‌ها و استفاده از محلول اسید اسکوربیک جهت کاهش مواد فنولیک صورت گرفت. برای سترون کردن جوانه‌ها از محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد در زمانهای مختلف (از ۲ تا ٦ دقیقه) استفاده شد. جوانه‌ها در آخرین مرحله شستشو در آب حاوی اسید اسکوربیک سترون نگهداری شد. ریزنمونه‌ها حاوی یک یا دو جوانه و یک پایه به ابعاد ۰/۵ تا ۱/۵ سانتیمتر بودند. قبل از قرار دادن روی محیط، ۱ تا ۲ میلیمتر از انتهای قاعده آن قطع گردید. از محیط کشت MS با ۱/٤ غلظت نیترات، و دارای هورمون 2ip[1] دارای غلظت ۰/۵ میلیگرم در لیتر برای استقرار اولیه جوانه‌ها استفاده شد و برای حذف ترشحات فنلی ریزنمونه‌ها، محلول ۱۰۰ میلیگرم در لیتر آسکوربیک اسید به ترکیب محیط کشت اضافه گردید.

پس از استقرار و رشد جوانه، شاخه زایی در دو نوع محیط کشت MS و DKW[2] با هورمونهای BA در غلظت ۰/۵ و 2ip و کینتین در غلظتهای ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر صورت گرفت. از هورمون اکسین IBA در غلظت ثابت ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر در تمام تیمارهای کشت استفاده شد. جهت آزمون آماری اعداد مربوط به ضریب ازدیاد یا

1- α-γ-γ Dimethyl allyl amino purine
2- Driver & Kuniyuki Walnut medium

قدرت تکثیر (متوسط تعداد جوانه و شاخه در هر تکرار) و رشد طولی شاخه‌ها، انتخاب شد. تعداد تکرارها در هر تیمار ۱۵ (۵ ظرف کشت و در هریک سه ریزنمونه) بود. آزمایشها در طی سه بازکشت که فاصله این بازکشت‌ها ٤ هفته بود انجام گردید. نتایج در قالب طرح فاکتوریل دو عاملی (عوامل: محیط کشت و هورمون) بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با کمک نرم افزار MSTATC، مورد بررسی قرار گرفت و حداقل تفاوت معنی‌دار در بین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ محاسبه شد. شاخه‌های طویل شده به مدت یکماه در محیط MS با ۱/٤ غلظت نیترات فاقد هر گونه هورمون کشت گردید. شاخه‌های بدست آمده از این مرحله در تیمارهای مختلف جهت تولید ریشه قرار داده شد. این تیمارها عبارت بودند از: ۱- کشت شاخه‌ها در محیط کشت حاوی هورمونهای IBA و NAA[1] در غلظتهای متفاوت (۱، ۳ و ۵) میلیگرم در لیتر و بعد انتقال نمونه‌ها به تیمارهای تاریکی کوتاه مدت، ۲- قرار دادن شاخه‌ها به مثابه یک ریز قلمه در محلول هورمون غلیظ IBA در مدت زمان کوتاه و انتقال آنها در محیط کشت فاقد هورمون.

– استفاده از ریزقلمه‌ها به عنوان ریزنمونه کشت: قلمه‌های شاخه گرفته شده از پایه کرمانشاه و شیراز پس از استریل با قارچ کش بنومیل ۵ در هزار برای مدت ۷ دقیقه و غوطه‌وری در محلول ۱۰۰۰ میلیگرم بر لیتر IBA برای مدت۲ دقیقه، به مخلوط ماسه و پرلیت استریل در گلدان و در شرایط گلخانه برده شد. پس از یک ماه جوانه‌های سبز شده بر قلمه‌های مزبور در محلول کلرورمرکوریک ۰/۱ درصد برای مدت ۳ دقیقه استریل شد و پس از شستشو با آب مقطر استریل به محیط کشت MS (۱/۳غلظت از نیترات) با هورمون 2ip و IBA به ترتیب در غلظتهای ۰/۵ و ۰/۰۱ میلیگرم بر لیتر برده شد.

1- Naphtylaceticacid

نتایج

با توجه به تیمارهای استریل (جدول شماره۱) فصل مناسب برداشت جوانه از نظر درصد زنده‌مانی نمونه‌ها پس از استریل، زمستان تشخیص داده شد که روش مناسب سترون سازی جوانه‌ها در این فصل استفاده از محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد به مدت ٦ دقیقه برای هر دو ژنوتیپ بود. وجود ترشحات فنلی فوق‌العاده زیاد از قاعده جوانه‌ها مانع از استقرار مناسب جوانه‌ها در محیط کشت بود و افزودن آسکوربیک اسید در غلظت ۱۰۰ میلیگرم در لیتر این مشکل را تا حدودی حل نمود. محدودیت استقرار جوانه‌های این گیاه به سه ماه از سال (آذر، دی و بهمن)، آلودگی نهان نمونه‌ها پس از سه بازکشت، شیشه‌ای شدن، کالوس‌زایی و عدم رشد فعال جوانه‌های جانبی نیز از دیگر مشکلات ریزازدیادی کیکم از طریق جوانه بودند. رفع عارضه شیشه‌ای شدن شاخه با کاهش سطح نیتراتهای محیط کشت تا ۱/٤ غلظت عادی و نیز تعویض هورمون سیتوکنین از BA به 2ip انجام شد. استفاده از هورمونهای GA و TDZ به‌ترتیب در غلظتهای ۰/۲۵ و ۰/۰۵ میلیگرم در لیتر تا حدودی در تحریک فعالیت جوانه‌های جانبی شاخه مؤثر بود. در تجزیه و تحلیل آماری، تأثیر متقابل تیمارهای محیط کشت و هورمون بر روی صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی شاخه کاملا معنی‌دار بود (جدول شماره ۲). مراجعه به جدول شماره ۳، نشان می‌دهد که محیط MS با ۱/٤ غلظت نیترات به همراه ۰/۵ میلیگرم در لیتر2IP و ۰/۱ میلیگرم در لیتر کینتین، بیشترین تعداد شاخه را تولید نمود و میانگین رشد طولی نیز در همین تیمار، دارای بیشترین مقدار بوده است. نتیجه ریشه‌زایی در تیمارهای اعمال شده بر نمونه‌ها، منفی بود.

– نتایج مربوط به کشت ریزقلمه‌ها به این صورت بود که این قلمه‌ها از هر دو ژنوتیپ برای دو ماه جوانه‌های سبز داشتند که این جوانه‌ها در محیط کشت مناسب شاخه‌زایی برده شد و شاخه‌های محدودی با رشد فعال جوانه‌های جانبی ایجاد نمود (شکل شماره ۲). در نتیجه استفاده از جوانه‌های قلمه به عنوان ریزنمونه کشت، نسبت به جوانه‌های شاخه، برای وصول به شاخه‌زایی وضعیت مناسبتری داشت، ولی به‌دلیل محدودیت تکثیر شاخه‌ها از این طریق، امکان انجام گسترده تیمارهای ریشه‌زایی مقدور نگشت.

بحث

نتایج آزمایشهای انجام شده نشان داد که بهترین فصل برداشت جوانه، اوایل زمستان بوده، چرا که خفتگی جوانه‌ها و پوشش ضخیم سطح ساقه و جوانه‌ها در این فصل با محافظت از بافتهای آسیب پذیر درونی نمونه‌ها امکان بکار بردن محلولهای سترون کننده را در غلظتهای بالاتر و مؤثرتر فراهم می‌سازد. از طرفی برس کشی سطح جوانه‌ها با مایع ظرفشویی و اتانل در حذف زواید سطح جوانه مؤثر بوده و آلودگیهای سطحی را تا حد امکان به حداقل می‌رساند. اتانل نیز با حذف لایه مومی سطح کوتیکول به محلول اصلی ضدعفونی اجازه داد که قدرت نفوذ و تأثیر بهتری را بر بافت نمونه داشته باشد (Enjarlic، ۱۹۸۸). کاهش نیترات محیط تا ۱/٤ غلظت آن در محیط پایه MS در حذف شیشه‌ای شدن شاخه مؤثر بود (Mclaughtin و Karnoskey، ۱۹۸۹). در تحقیق حاضر، تجزیه و تحلیل آماری صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی جوانه‌ها بیانگر این واقعیت است که محیط MS با ۱/٤ غلظت نیترات به همراه ۰/۵ میلیگرم در لیتر 2IP و ۰/۱ میلیگرم در لیترکینتین، به طور محسوسی بر سایر تیمارهای بکار رفته برتری دارد. یکی از عوامل تعیین کننده کارآیی محیط کشت، نوع املاح و مجموع قدرت یونی آن

می‌باشد. غلظت کلی ازت در محیط MS از محیط دیگر بالاتر است و برای حذف پدیده شیشه‌ای شدن غلظت ازت تا ١/٤ غلظت آن در محیط پایه کاهش داده شد، ولی نسبت یون آمونیم به نیترات همچنان بیشتر از محیط دیگر بود که رشد مناسب شاخه‌ها را باعث گردید. در منابع مختلف نیز به نقش مثبت یون ازت در کیفیت شاخه‌ها، حجم برگها و محصول کلی زی‌توده[1] اشاره شده است (McCown و Sellmer، ١٩٨٢).

یون کلر نیز در محیط MS بیشتر است. کلر در فتوسنتز و حفظ فشار تورژسانس درحین خروج پتاسیم از سلولها، نقش دارد. بنابراین قدرت یونی و ترکیب مواد موجود در محیط (نیترات ١/٤) MS برای کیکم مناسبتر بوده است (جدول شماره ٤).

Biondi و همکاران (١٩٨٤) به دلیل اثرات نامطلوب استفاده از غلظت بالای BA از جمله رشد چند شاخه‌ای گیاه نارون، مقادیر کمتر BA یا تعویض آن با سیتوکنین مناسب دیگر را برای تکثیر توصیه نمودند، که در این تحقیق نیز برای حذف رشد چند شاخه‌ای از هورمون 2ip به جای BA استفاده شد.

استفاده از هورمون ژیبرلیک اسید برای افزایش رشد طولی شاخه‌های کیکم مؤثر بود (شکل شماره ٢). Mcgranahan (١٩٨٧) درتکثیر و افزایش رشد طولی شاخه‌های گردوی هیبرید و امام (١٣٧٩) در مورد گردوی ایرانی به نتایج مشابهی دست یافتند.

در تشکیل شاخه‌های نابه‌جا، تلفیق تیمار سیتوکینین به همراه اکسین در مقادیر غلظتی پایین، معمولا مؤثر می‌باشد، به خصوص برای آغاز شاخه‌زایی، تأثیر اکسینهای طبیعی مانند IBA به مراتب بیشتر از اکسین مصنوعی است (Bonga و Aderkas، ١٩٩٢)، در بررسی اخیر این مسأله به‌خوبی نمایان بوده است.

در توضیح رشد محدود جوانه‌های گرفته شده از قلمه‌های درخت بالغ کیکم می‌توان به گزارش Vietz و همکاران (١٩٨٧) اشاره نمود که متوجه کاهش ریشه‌زایی

1- Biomass

قلمه‌های گرفته شده از پایه بالغ chestnut نسبت به نهال بذری این گونه شده و علت آن را در وجود مواد بازدارنده رشد در نمونه‌های بالغ یافتند. با توجه به وجود ترکیبهای فنلی در درون بافتهای گونه مورد بررسی، از محلول اسید آسکوربیک و زغال فعال برای حذف این ترشحات استفاده شد. Sanjose (۱۹۸۸) تأثیر ترکیب زغال فعال بر حذف مواد بازدارنده رشد و افزایش درصد ریشه‌زایی شاخه‌های گیاه بالغ *Quercus* را اذعان داشت.

یکماه قبل از تیمار اکسین برای القای ریشه، شاخه‌ها در محیط بدون هورمون کشت شدند. Curir (۱۹۹۰) در تحقیقی بر تأثیر فلاونوییدها بر القای تشکیل ریشه توسط اکسین در شاخه‌های اوکالیپتوس به این واقعیت دست یافت که جهت تحریک شاخه‌ها به ریشه‌زایی، اعمال پیش تیمار محیط کشت بدون هورمون کاملاً ضروری می‌باشد.

مهمترین یافته این پژوهش، عبارت از این بود که امکان ریزازدیادی کیکم از طریق کشت جوانه و ریزقلمه تا مرحله رشد و تکثیر شاخه میسر است، ولی برای طی مسیر فوق تا ایجاد گیاه قابل انتقال به خاک نیاز به تحقیق بیشتر می‌باشد.

کشت بافت کیکم با توجه به نتایج پژوهش حاضر و نیز نتایج سایر محققان هر چند هنوز روشی چندان اقتصادی و با صرفه نمی‌باشد، اما با توجه به اهمیت احیاء مجدد پایه‌های کیکم در جنگلها به دلیل رو به انقراض بودن این گونه پیشنهاد می‌شود که در موارد زیر پژوهشهای بیشتری انجام گیرد. ۱- کشت بذرها و جنین کیکم جهت تکثیر انبوه گیاه، ۲- بررسی امکان اندام‌زایی در کالها و کشت سوسپانسیون کیکم.

جدول شماره ۱: مناسبترین روشهای سترونسازی جهت پایه‌های مختلف

محل و فصل برداشت	تیمارسترون سازی M(دقیقه)	درصد آلودگی قارچی	درصد آلودگی باکتریایی	درصد جوانه سبز	درصد جوانه مرده و سوخته
پایه ۱ پاییز	۲	صفر	۱٦/٦	۸	۷٥/٤
پایه۱ زمستان	٦	صفر	۱۷/٥	۱۲	۷۰/٥
پایه ۲ پاییز	۲	صفر	۲۳/۳	۱۰	٦٦/۷
پایه۲ زمستان	۶	صفر	۱۰	۱٦/٦	۷۳/٤

M= محلول کلرور مرکوریک ۰/۱ درصد

جدول شماره۲ : نتایج تجزیه واریانس صفات ضریب ازدیاد و رشد طولی گیاهچه‌ها

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		ضریب ازدیاد	رشد طولی
A	۱	۱/۰٥۱**	۰/۱٥ ^{ns}
B	۳	۰/۲۷^{ns}	۰/۰۱۸^{ns}
تأثیر متقابل A×B	۳	۳/۹۷۸**	۰/۳۹۱**
خطا	۸	۰/۱٦٥	۰/۰٦۹

A: محیط کشت، B: تیمارهای هورمونی، ** در سطح ۰/۰۱ معنی دار و ns: اختلاف غیر معنی‌دار

جدول شماره ۳: مقایسه میانگین‌های عوامل رشد تحت تأثیر محیط و هورمون درسطح ۰/۰۱

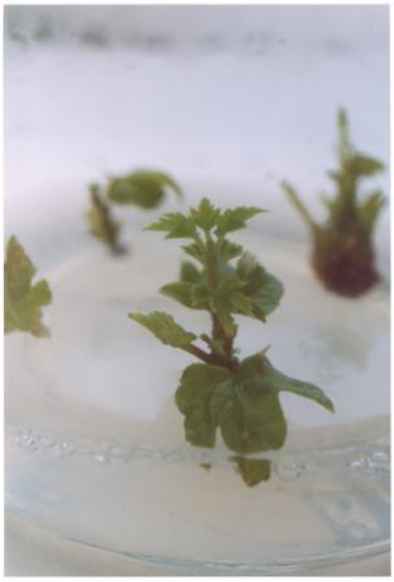
ردیف	تیمار	میانگین ضریب ازدیاد	میانگین رشد طولی
۱	MSN/4 B0.5 P0.5	۱/۷۵ cd	۰/ ۷۵ab
۲	MSN/4 P0.5K0.1	۳/۵a	۱/۲۵ A
۳	MSN/4P0.1K0.5	۰/۸۷۵de	۰/۳۷۵ b
٤	MSN/4P0.5	۲/۷۵ab	۰/۷۵ Ab
۵	DP0.5K0.1	۲/٦abc	۰/۷ Ab
٦	DP0.1K0.5	۰/٦۷۵e	۰/۲۵ B
۷	DP0.5	۲/۳bc	۰/۹b
۸	DP0.5B0.5	۱/۲۵de	۰/٦۲۵Ab

حروف مشابه در هر ستون بیانگر اختلاف غیر معنی‌دار می‌باشد.

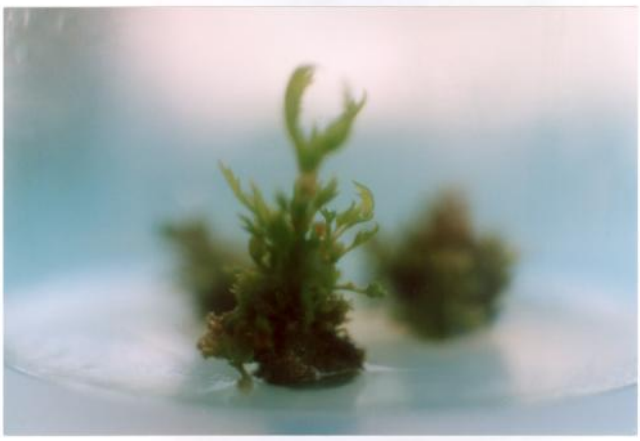
B هورمون BAP-٦, K هورمون Kinetin و p هورمون 2ip

جدول شماره۴: مقایسهٔ غلظت‌یونی نمکهای موجود در محیط‌های کشت

یون	MSN/4	DKW
NH_4^+ (mM)	۵/۱۵۲۵	۱۷/۵
K^+	۱۰/۵۲	۲۰
Mg^{++}	۱/۵	۳
Ca^{++}	۲/۹۹	۹/۳
Na^+	۰/۲۲٤	۰/۳
NO^-_3	۹/۸۵	۳٤/٤
PO^-_4	۱/۲۵	۲
SO^{--}_4	۱/۷٦	۱۲/۳
Cl^-	٦	۲
I^- (µM)	۵	–
Mn^{++}	۱۳۲	۱۹۸
Zn^{++}	۲۹	۵۷
B^{+++}	۱۰۰	۷۸
Mo^{+++}	۱/۰۳	۱/٦
Co^{++}	۰/۱۰۵	–
Cu^{++}	۰/۱	۱
Fe^{++}	۱۰۰	۱۲۲
Ni^{++}	–	۰/۰۲
N (mM)	۱۵/۰۰۲۵	٤۲/۳
NH_4/NO_3 (Mm)	۰/۵۲	۰/۲۲
قدرت یونی کل (mM)	۳۹/۹۱۸	۹٤/۰۷٤



شکل شماره ۱: شاخه‌های حاصل از رشد جوانه کیکم بر محیط کشت



شکل شماره ۲: شاخه حاصل از رشد ریزقلمه کیکم بر محیط کشت

سپاسگزاری

از همکاران عزیزم در گروه کشت بافت خانمها مهندس طیبه سهیلا نراقی و مهندس شکوفه شهرزاد، به دلیل همکاری بی‌دریغ در اجرای این تحقیق و نیز همکاران محترم در استانهای شیراز و کرمانشاه آقای مهندس یحیی حمزه‌پور و خانم مهندس معصومه خان‌حسنی که کمال همکاری را در جمع‌آوری و ارسال نمونه‌ها با ما داشتند و همچنین از آقای دکتر ابراهیم شریفی عاشورآبادی به دلیل هم فکری در اجرای عملیات آماری تشکر می‌نمایم. از سایر همکاران در بخش که نهایت مساعدت را با ما داشتند سپاسگزارم.

منابع

۱. امام، م. و ایزدپناه، م.، ۱۳۷۹. ریزازدیادی گردوی بالغ ایرانی (*Juglans regia*) به شیوه کشت بافت. فصلنامه تحقیقات ژنتیک گیاهان مرتعی و جنگلی ایران (۱). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صفحه ۷۳-۵۳.

۲. بابابیان، م.، ۱۳۸۰. بررسی اوت اکولوژی کیکم *Acer monspesonalum* subsp.*Cinerasens* در سه منطقه استان فارس (فیروزآباد، سرچهان و سپیدان). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز:۱۷۸.

3. Biondi, S., Canciani, L. Bagni, N., 1984. Uptake and translocation of benzyladenin by elm shoots cultured *in vitro*. Can.J. Bot, 62:2385 -2390.
4. Bonga, J.M., Aderkas, P.V., 1992. *In vitro* culture of trees, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 35-39.
5. Chalupa,V., 1987a. European Hardwood. In: J M Bonga and Durzan, D. J (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry, vol 3: Gymnosperms, Angiosperms, Palms, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht: 224-246.
6. Chalupa,V., 1990. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur*) and Linden (*Tillia cordata* Mill). Plant Cell Reports, 9 : 398-401.

7. Cheng,T.Y., 1978. clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. proc Int plant propagators Soc, 28 : 139-155.
8. Curir,P., Sumerect V., Termini, A., 1990. Flavonoide accumulation is correlated with adventitious root formation in *Eucalyptus gunnii Hook* micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiol, 92: 1148-1153.
9. Driver,J. A & Kuniyuki, H., 1984. *In vitro* propagation of *Paradox walnut* root stocks (*J.hindsii* J. regia*). Hort Science, 19:507-509.
10. Enjarlic, F. & Lardet, L., 1988. Contamination of primary culture in tropical areas. Acta Hort, 225: 57-65.
11. Mclaughtin, J & Karnoskey, D. F., 1989. Controlling vitrification in *Larix deciduas* via culture media manipulation. Canadian J for Res, 19: 1334-1337.
12. Mcclelland, M.T., Smith. MAL., Carothers, Z.B, 1990. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on the subsequent microcutting root quality in three woody plants. Plant cell tissue organ culture, 23: 115-123.
13. Mcgranahan, G.H., 1987. Tissue culture of Juglans. In: Bonga and Durzan(edt). Cell and Tissue Culture in Forestry.vol 3, Martinus Nijhoff (pub): 261-271.
14. McCown, B.H. and Sellmer, J.C., 1982. Media and physical environment. In: Bonga, J.M and D.J. Durzan. Cell and Tissue Culture in Forestry. VoL 1, General principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Pordrecht: 4-17.
15. Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised Medium for rapid growth and bio- assays with *tobacco* Tissue Culture. Physiologia plantarum, 15: 473-597.
16. Northcote, D.H.,Wright, k. 1972. Induced root differentiation in Sycamore callus. J Cell Sci 11: 319-337.
17. Rohr, R. 1985. Vegetative propagation of wavy grain Sycamore maple *(Acer pseudoplatanus L*) (Personal communication).
18. Sanjose, M.C., 1988. Factors effecting *in vitro* propagation of Quercus.robur L.Tree physiol, 4: 281-290.
19. Vieitez, J., Vieitez. E, 1987. Identification of two compounds correlated with the lack of rooting capacity of chestnut cuttings. Tree physiology, 3:247-255.
20. Withers, L.A., 1976. Studies on the growth in culture of plant cells.XII. Fine structural features of *Acer pseudoplatanus L*. J Exp Bot, 27:1073-1084.