دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۱، صفحه ۱۲-۱ (۱۳۹۶)

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

عباس صفرنژاد[۱*] و هادی درودی[۲]

*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 کیکم یکی از گونه‌های مهم جنس *Acer* از خانواده Aceraceae می‌باشد. زیرگونه turcomanicum در جنگل های 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 می یابد. متأسفانه، بسیاری از رویشگاه‌های این گونه تحت تأثیر چرای دام و دخالت‌های انسانی با تخریب زیادی مواجه شده است. به‌دلیل 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 محیط های هورمونی مختلف انجام و غلظت‌های مختلف هورمونی برای باززایی کالوس بررسی شد. از بین محیط های 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. بطورکلی محیط پایه MS و هورمون TDZ برای باززایی کالوس گونه کیکم ترکمنی مناسب می باشد . گیاهچه های باززایی شده به‌منظور سازگاری به گلدان منتقل و بعد به خاک انتقال یافتند.

واژه‌های کلیدی: افراکیکم، باززایی، کالوس، TDZ.

مقدمه

کیکم ترکمنی با نام علمی *Acer monospessulanum* subsp. turcomanicum یکی از پنج زیرگونه افرا کیکم می‌باشد که در ایران می‌روید. این گیاه یکی از گونه‌های مهم جنس *Acer* از خانواده Aceraceae است (Mozaffarian, 2004). زیرگونه turcomanicum در جنگل های ناحیه رویشی ایران‌تورانی به‌عنوان گونه همراه ارس در ارتفاعات استان‌های خراسان رضوی و شمالی انتشار دارد (Sabeti, 1992). طبق رده بندی Sagheb Talebi و همکاران (۲۰۰۴) این گونه جزو گونه‌های در حال انقراض

و در گروه ذخایر طبیعی مدیریت‌یافته قرارگرفته است. این گونه در نواحی شمال‌شرق 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 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 به شدت مورد حمله آفات بذرخوار بوده و پس از رسیدن، در رویشگاه‌های مختلف، ۷۰ـ۵۰ 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 کم نیاز 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 رویشگاه های 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 این رو استفاده از روش‌های غیرجنسی به‌منظور تولید نهال های 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 راه های 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 (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 جنین های 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 به روش 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 شاخه های 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 Vlašínová 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 هورمون 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

محیط کشت DKW به‌دست آوردند. آنان به این نتیجه رسیده‌اند که DKW می‌تواند برای تکثیر استفاده شود و IAA باعث ریشه زایی می‌گردد. همچنین Wilhelm (۱۹۹۹) ریزازدیادی افرا شبه چناری از طریق تشکیل شاخساره نابجا با استفاده از Thidiazuron را مورد بررسی قرار داد و بهترین میزان پر آوری را با ۰/۰۴ میکرومولار TDZ و ۰/۱ میکرومولار BA بدست 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 به‌همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در بستر پایه WPM استفاده شد و بیشترین ریشه زایی در بستر پایه نیم غلظت WPM همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. در ریزازدیادی افرا شبه چناری توسط Latteir و همکاران (۲۰۱۳) از محیط های MS، QL و WPM که غلظت های مختلف هورمونی به آن افزوده شده بود استفاده شد و بیشترین تعداد ساقه و ارتفاع ساقه در غلظت دو میکرومول BAP بدست آمد. ضمن اینکه بهترین ریشه‌زایی در ده میکرومول هورمون IBA حاصل شد.

هدف از این تحقیق، بررسی باززایی غیرمستقیم کیکم 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 کم نیاز در فضای سبز شهری و تنوع بخشی به گونه‌های فضای سبز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه افرای مورد مطالعه به‌منظور 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 جمع‌آوری شدند و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه کشت بافت انتقال یافتند. ریزنمونه از بخش‌های مختلف گیاه ازجمله جوانه انتهایی و میان گره تهیه شد. ابتدا پیش‌تیمارهای ضدعفونی شامل جدا کردن برگ های اضافی، قسمت‌های پوسیده و قدیمی و قراردادن در زیر آب جاری به‌مدت یک تا دو ساعت به‌منظور حذف آلودگی‌های سطحی انجام شد. سپس تیمار ضد عفونی مناسب با بررسی روش‌های مختلف ضدعفونی بدست 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 به‌منظور ضدعفونی ریزنمونه‌ها سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل زیر هود لامینار، انجام شد.

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

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

آزمایش اول: به منظور بررسی باززایی غیرمستقیم، کالوس های تولید شده از ریزنمونه های کشت شده به‌منظور 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. تیمار های هورمونی مورد استفاده برای باززایی غیرمستقیم در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به‌منظور 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+۱mg/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+ ۱mg/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 + ۰/۱mg/l BAP	۳۹	MS + ۱ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l IBA
۱۹	MS + ۰/۰۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۵mg/l BAP	۴۰	MS + ۳ mg/l TDZ + ۰/۱ mg/l IBA
۲۰	MS + ۰/۰۰۱ mg/l TDZ + ۰/۱mg/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 + ۰/۲۵mg/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 ، به‌منظور بررسی باززایی غیرمستقیم کالوس های حاصل از مرحله قبل به محیط های با ترکیبات مختلف هورمونی منتقل شدند (جدول ۳).

به‌منظور بررسی تعداد ساقه‌چه و رشد ساقه‌چه‌های ایجاد شده، کالوس های باززایی شده به محیط های 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 به‌منظور بررسی باززایی در آزمایش دوم

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

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. به‌منظور سترون کردن محیط‌های تهیه شده از اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر و زمان ۱۵ دقیقه استفاده شد. کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی که با استفاده از لامپ های فلورسنت سرد تأمین می‌شد، نگهداری شدند. واکاشت‌ها نیز هر چهار هفته یکبار انجام شد. البته در مورد میزان آهن مورد استفاده به‌علت زرد شدن گیاهچه‌ها در مرحله باززایی برای گیاهچه‌های باززایی شده از کالوس نیز از دو برابر آهن محیط MS استفاده شد. گیاهچه‌ها به‌منظور انتقال به‌شرایط خارج‌شیشه‌ای باید به‌تدریج 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 قالب‌طرح کاملا تصادفی‌با ۳۰ تکرار اجراشد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و پس از تعیین همگنی و نرمال‌بودن داده‌ها، برای مقایسات کلی از آزمون تجزیه واریانس و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح احتمال۵ درصد استفاده شد

نتایج

کالوس‌زایی و باززایی

نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر درصد کالوس زایی بین تیمارهای مختلف مورد بررسی وجود داشت (جدول ۵). نتایج بررسی میانگین درصد کالوس زایی ریزنمونه ها در تیمارهای مختلف با افزایش غلظت هورمون های مورد استفاده میزان کالوس زایی افزایش یافت (جدول ۶). درصد باززایی ریزنمونه ها با تجزیه واریانس بررسی شد و تفاوت معنی‌داری از این نظر بین ترکیب های هورمونی مختلف وجود دا شت (جدول ۵). در بین تیمارهای باززایی مورد استفاده تیمارهای ۶، ۷ و ۱۲ (یعنی MS + ۵mg/l BAP، ۰/۱ mg/l IBA + mg/l Kin و MS+۳ mg/l BAP + ۰/۱mg/l IBA و MS+۵) 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

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

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

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

	تیمار هورمونی	درصد باززایی ریزنمونه	درصد کالوس‌زایی
۱	MS	۰/۰ b	۰/۰ d
۲	MS+۰/۵ mg/l BAP	۰/۰ b	۲۲/۲ ± ۶/۴۱ bc
۳	MS+۱mg/l BAP	۰/۰ b	۱۴/۲ ± ۴/۰۷ cd
۴	MS+۲ mg/l BAP	۹ ± ۳ b	۱۸/۲ ± ۱/۷۹ c
۵	MS+۳ mg/l BAP	۷/۱ ± ۴/۱۳ b	۱۴/۳ ± ۱/۸۵ cd
۶	MS+۵ mg/l BAP	۲۶/۳ ± ۵/۰۳ a	۳۶/۴ ± ۴/۷۳ ab
۷	MS +۰/۱ mg/l IBA + ۳ mg/l Kin	۲۵ ± ۷/۲۱ a	۲۵ ± ۴/۶۲ abc
۸	MS +۰/۱ mg/l IBA +۰/۵ mg/l BAP	۰/۰ b	۲۵ ± ۳/۴۶ abc
۹	MS +۰/۱ mg/l IBA +۱ mg/l BAP	۴/۷۳ ± ۲/۳۷ b	۲۸ ± ۲/۵۲ abc
۱۰	MS +۰/۱ mg/l IBA +۲ mg/l BAP	۹/۱ ± ۵/۲۵ b	۲۷/۳ ± ۱۰/۵۱ abc
۱۱	MS +۰/۱ mg/l IBA +۳ mg/l BAP	۹/۴۷ ± ۶/۲۶ b	۳۵/۷ ± ۸/۲۶ ab
۱۲	MS +۰/۱ mg/l IBA +۵ mg/l BAP	۲۹/۲ ± ۴/۱۷ a	۴۱/۳۷ ± ۵/۰۸ a

حروف مختلف بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ می‌باشد.

نتایج آزمایش اول در مورد باززایی از کالوس نشان داد که در ۴۲ تیمار هورمونی که به منظور باززایی از کالوس مورد آزمایش قرار گرفت ، فقط در تیمار ۳۱، (۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin)

باززایی از کالوس انجام شد. اما برگ‌های گیاهچه‌های ایجاد شده دچار عارضه شیشه‌ای شدن شدند و حتی با کاهش میزان سیتوکنین محیط و همچنین افزایش میزان آگار محیط نیز بهبود نیافت و بعد از یک ماه برگ ها 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 MS + mg/l BAP ۱ منتقل شدند و برای حدود دو ماه (دو نوبت واکشت) 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 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 ترکیب های 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).

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

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

*: 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

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

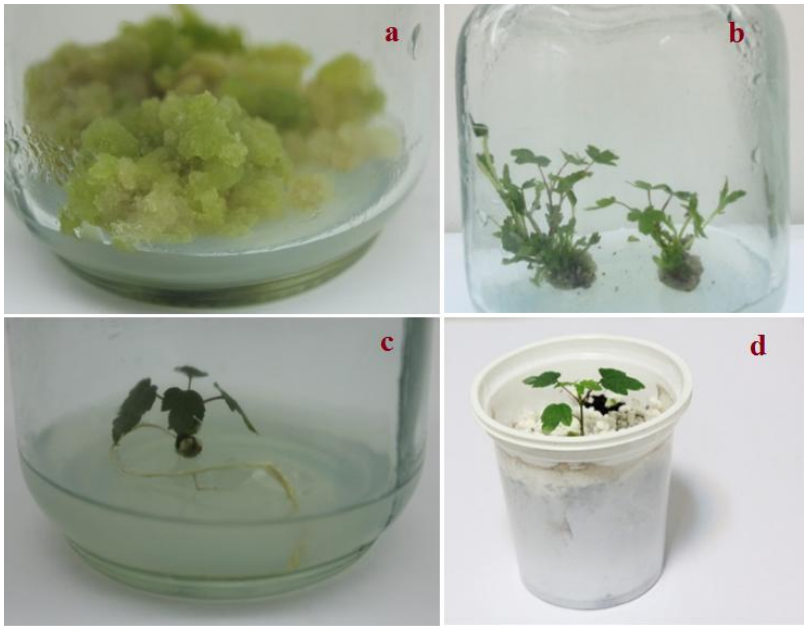
Ns: عدم وجود تفاوت‌معنی‌دار

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.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد (جدول ۹) که در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ بیشترین تعداد ساقه زایی وجود داشته و سایر تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌داری از این نظر با هم نداشتند. گیاهچه‌های تولید شده در محیط MS فاقد هورمون ، اقدام به ریشه‌زایی کردند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از انتقال به شرایط خارج از شیشه در بستر کوکوپیت – پیت‌ماس به‌خوبی مستقر شده و با شرایط محیط سازگار شدند.



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

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 می باشد و این ترکیبات می توانند باعث افزایش تقسیم سلولی، تمایز، رشد و توسعه ساقه های چندتایی در شرایط درون شیشه شوند (Sotiropoulos *et al.*, 2005). در این زمینه Tomas و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش کردند که سیتوکینین ها از آدنین مشتق شده اند و فرایند ریخت زایی را به وسیله ایجاد دو اثر فوری تحریک سنتز DNA و افزایش تقسیم سلولی بر سلول‌های تمایز نیافته تسریع می‌کنند. در این تحقیق باززایی در مقادیر نسبتا بالای سیتوکینین یعنی مقادیر ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و کینتین انجام شد. بنظر می‌رسد مقادیر این هورمون ها در بافت گیاه برای تحریک شاخه زایی کم بوده و ریزنمونه ها 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 کیکم‌ترکمنی مقدار پنج میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین میزان باززایی را به خود 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 کـه تیمار سیتوکنین به همراه اکسین در غلظت های

ضعیف در ایجاد شاخه های نابجا، به‌خصوص در آغاز شاخه‌زایی مؤثر بوده است . همانطور که در قسمت نتایج مشاهده شد بیشترین میزان کالوس زایی در مقادیر نسبتا بالای BAP رخ داد که در همین رابطه نیز ذکر شده است که مهمترین سیتوکینین به‌منظور تولید کالوس، BAP می‌باشد که در غلظت های ۰/۵ تا پنج میکرومولار برای تولید کالوس استفاده شده است (Sayed Tabatabaei & Omidi, 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 به‌ژنوتیپ اجتناب ناپذیر و کلی است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می کند 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 تعیین کننده 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 شده‌است 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 کالوس‌دهی تا شکل‌گیری جنین سوماتیک را به‌دنبال دارد (Yucesan *et al*., 2007 و Mroginski *et al*., 2004). 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 شده‌است (Husain *et al*., 2007، Gallo-Meagher *et al*., 2000، Mroginski *et al*., 2004 و Sujatha *et al*., 2007). هورمون TDZ نسبت به سیتوکینین های داخلی گیاه کمتر به آنزیم‌های 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 سایتوکنین ها را تغییر داده و موجب افزایش سطح سایتوکنین درونی به وسیله بازدارندگی عملکرد سیتوکنین 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 (Radhika *et al*., 2006 ،Neto *et al*., 2003). ایجاد شرایط رشدی بهینه می‌تواند به خصوصیت ویژه TDZ برگردد. اگرچه این هورمون در گروه سیتوکینین ها قرار می‌گیرد، ولی یکی از ویژگی های منحصر به فرد آن بروز همزمان اثر اکسین ها و سیتوکینین هاست. این در حالی است که از نظر ساختاری کاملا 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 ساقه های تولیدی تفاوت معنی‌داری از خود نشان ندادند . یکی از نقش هایی که برای هورمون TDZ عنوان شده، القاء و تحریک شاخه زایی می‌باشد. توانایی تنظیم کنندگی مورفولوژی توسط هورمون TDZ به کاربرد آن در کشت گیاه، اندام و سلول برای بهبود دستورالعمل‌های باززایی منجر شده است . عنوان شده که TDZ باعث القاء جوانه زایی در بسیاری از گیاهان می‌شود.

...

ضمن اینکه TDZ نقش مهمی در ریخت‌زایی دارد و غلظت‌های پایین آن باعث تکثیر جوانه های جانبی می شود، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر آن باعث توسعه ساقه های نابه‌جا می شود (Guo *et al*., 2011). هورمون TDZ تحت تأثیر یک‌سری از فرایندهای زیستی در سلول ها ایجاد می‌شوند یا افزایش می یابند اما نحوه عملکرد آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است. بااین‌حال، 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: تنظیم غشای سلولی، سطوح انرژی، جذب، انتقال و تجمع عناصر غذایی (Guo *et al*., 2011). بطورکلی، 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 تولید شده 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 cinerasens* 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 cinerasens* through embryo culture. Iranian Journal 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*

sensitivity of seeds in *Acer monspessulanum* L. Journal of Forest and Wood Products, 66: 293- 304.
- Sayed Tabatabaei, B.E. and Omidi, 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.
- Vlašínová, 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.

monospessulanum 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 monospessulanum* 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., Kavoosi, M.R. and Ali-Arab, A., 2013. Storage behavior and desiccation

Indirect regeneration of *Acer monospessulanum* by *in vitro* techniques

A. Safarnejad[1*] and H. Darroudi[2]

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 monospessulanum 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 vigority were affected by different concentrations of TDZ hormones. MS media supplemented by 0.5 mg/l TDZ had the highest shoot production. But vigority 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 monospessulanum*, callus, regeneration, TDZ.