

## تکثیر گونه کیکم (*Acer cinerasens*) به روش کشت جنین بذری

میترا امام<sup>۱</sup>، شکوفه شهرزاد<sup>۱</sup>، طیبه سهیلا نراقی<sup>۱</sup>، معصومه خان حسنی<sup>۲</sup> و یحیی حمزه پور<sup>۳</sup>

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، گروه تحقیقات زیست فناوری، تهران، ص. پ. ۱۱۶-۱۳۱۸۵ E-mail: memam@rifr-ac.ir

۲- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، کرمانشاه

۳- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، شیراز

### چکیده

درخت کیکم (*Acer cinerasens*)، از گونه‌های مهم و با ارزش جنس افرا (*Acer*) است. در پژوهش حاضر، امکان تکثیر گونه کیکم به روش کشت جنین بذری بررسی شد. نمونه‌ها از پایه برگزیده در رویشگاه طبیعی گیاه واقع در جنگل سرچهان شیراز در فصول مختلف سال، برداشت و پس از سترون‌سازی با تیمارهای متفاوت، در محیط کشت MS دارای انواع هورمونهای سیتوکینینی و اکسینی، مورد کشت قرار گرفت. در مورد کشت جنین بذر رسیده، روش کار عبارت از قراردادی بذرها در مقابل آب جاری و بعد سترون‌سازی آنها با محلول کلوروجیوه ۰/۱ درصد بود. جنین داخل بذرها به محیط کشت مختلف برده شد و محیط MS تغییر یافته، برای رشد جنین مناسب تشخیص داده شد، به طوری که پس از یک ماه ۳۵٪ نمونه‌ها در این محیط ایجاد دانه‌رست نمودند. دانه‌رستها بعد از طی مراحل مختلف سازگاری به خاک گلدان منتقل شدند. با توجه به مشکلات تکثیر گیاه کیکم از طریق روشهای مختلف جنسی و غیرجنسی وصول به گیاهچه گونه مزبور از طریق کشت جنین به نوبه خود می‌تواند ارزشمند باشد که در این تحقیق میسر گردید.

واژه‌های کلیدی: کیکم، کشت درون شیشه‌ای و کشت جنین

### مقدمه

این درخت در جنگلهای لرستان، ایلام، کردستان، کرمانشاه و بختیاری با جامعه درختان بلوط غرب در ارتفاع ۱۷۵۰ متری و با دمبرگ طویل همراه است، همچنین در سبزپوشان فارس در ارتفاع ۱۰۰ متری با دمبرگ کوتاه دیده می‌شود. نامهای محلی آن در غالب نقاط مانند لرستان، فارس و بختیاری، کیکم و در کردستان کیکف است. چوب این درخت مصارف صنعتی و زینتی داشته، در صنعت برای تهیه چوب سبک کشت شده و از نظر مصرف زینتی در درختکاریهای حواشی خیابانها از آن استفاده می‌شود. در روستاها از آن برای پوشش خانه و تهیه لوازم آشپزخانه و از برگ آن برای تعلیف دام استفاده می‌گردد (ثابتی، ۱۳۵۵).

مشکلات تکثیر جنسی این گیاه از طریق بذر، چرای مفرط و بدشکلی توده‌های جنگلی است که سبب ایجاد بذرهای نارس، ناسالم و آفت‌زده با قوه نامیه نامناسب می‌شود. از طرفی بذرهای کیکم به دلیل خشک شدن سریع قادر به زنده‌مانی در طولانی مدت نبوده و این مشکل، جنگلکاران را به تکثیر غیرجنسی گونه مزبور متمایل نموده است. در مورد بیشتر گونه‌های سخت چوب نظیر افرا به دلیل طولانی بودن دوره جوانی، عدم گلدهی مناسب و مشکل ریشه‌دهی قلمه‌ها به ریزازدیادی آنها توجه خاص شده است (بابائیان، ۱۳۸۰). کمبود نهال کیکم در منطقه و کندی رشد آنها، پوکی غالب بذرها و قوه نامیه نامناسب آنها نیز مزید بر علت شده و باعث گردیده تا ریزازدیادی گونه مزبور هم از طریق کشت

**۲- استقرار جنین در محیط کشت:**

در این مرحله در زیر هود مخصوص کشت بافت و با استفاده از لوپ و بکارگیری دو پنس ظریف و اسکالپل تیز، پوسته بذرها شکافته شد و جنین‌ها با احتیاط خارج و در ۴ نوع محیط شامل محیط کشت MS (Murashige & Skooge, 1962) پایه، MS تغییر یافته و فاقد هورمون گیاهی، کاغذ صافی مرطوب در درون پتری‌دیش و ترکیب خاک پیت / ورمیکولیت استریل کشت شدند.

ترکیب محیط کشت تغییر یافته، محیط MS کامل دارای مایه خمیر ترش به میزان ۱ گرم در لیتر، کازئین و اسید آسکوربیک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و زغال فعال در میزان ۵ گرم در لیتر بوده است. تعدادی از بذرهای استریل شده نیز در روی کاغذ صافی درون پتری‌دیش قرار گرفت تا جوانه‌زنی بذر در شرایط استریل و کنترل شده آزمایشگاهی مورد آزمون قرار گیرد و آنگاه نمونه‌های مزبور در شرایط استریل زیر هود به درون ترکیب خاک ورمیکولیت/پیت استریل بازکشت شد.

**۳- مرحله انتقال دانه‌رستها به خاک و سازگاری آنها با محیط:**

پس از تشکیل دانه‌رست از بذرهای کشت شده، نمونه‌ها در گلدانهای حاوی خاک پیت/پرلیت استریل دارای سرپوش پلاستیکی برای حفظ حداکثر رطوبت گیاه، غرس شد. گیاهان حاصل پس از طی مراحل تدریجی سازگاری به گلخانه منتقل گردیدند.

**نتایج**

درصد زنده‌مانی و تولید گیاه از جنین‌های کشت شده در فصل بهار ۲٪ می‌باشد. علت پائین بودن این درصد، نارس بودن جنین‌ها در این فصل بوده است. در حالی‌که زنده‌مانی و تولید گیاه از بذرهای جمع شده در فصل تابستان به ۳۰ درصد رسید. جنین‌های کشت شده در محیط

جوانه و هم کشت جنین، دارای اهمیت خاصی باشد. آنچه باعث برتری این روش بر سایر روشها می‌باشد، سرعت تکثیر و امکان کاربرد آن در مورد گیاهان بالغ و مسن است و در این روش کلیه خصوصیات درخت مادری به گیاهان تولیدی انتقال می‌یابد.

با وجود انتشار گزارشهای موفق ریشه‌دهی از قلمه گیاهان بالغ صنوبر، بلوط، بید و نارون، در مورد افرا استفاده از قلمه‌های ریشه‌دار به دلیل فقدان ظاهر مناسب در رشد بعدی آنها محدود گشته است. Chalupa در سال ۱۹۸۷ نتیجه گرفت که در مورد بعضی مخروطیان و تعداد کمی از جنس‌های درختان سخت‌چوب نظیر *Acer* و *Fagus*، ریزازدیادی با ریزنمونه‌های گرفته شده از درختان بالغ با مشکل روبرو است.

**مواد و روشها****انتخاب پایه و برداشت نمونه**

پایه برگزیده از نظر سن و سلامت (مرغوبیت چوب) به عنوان پایه مادری انتخاب و علامت‌گذاری شد.

پایه بالغ موجود در منطقه سرچهان شیراز: قطر درخت ۳۰ Cm، ارتفاع درخت ۶ متر، ۲۰-۱۵ سال

**روش کشت جنین بذری****۱- پیش تیمار آماده‌سازی بذر:**

بذرهای جمع آوری شده از پایه کبک در فصل تابستان (انتهای تیر ماه) بود و جهت کاهش مقاومت پوسته بذر پس از حذف باله، آنها برای دو شبانه روز تحت تیمار شستشوی مداوم با آب قرار داده شدند. بعد نمونه‌ها با محلول کلرومرکوریک ۰/۱ درصد برای ۳ تا ۵ دقیقه سترون شدند. جهت حذف مواد سترون‌کننده، بذرها ۳ بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد.



شکل ۲- استقرار دانه‌رستهای کیکم در خاک گلدان در شرایط سازگاری با محیط

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس کشت جنین‌های جنسی کیکم با تبدیل  $\sqrt{X+1/2}$

MS		درجه آزادی	منبع تغییرات
دانه رست	ریشه‌چه		
۱۰/۲۰۹**	۰/۳۷ ns	۳	محیط کشت A
۰/۰۶۷**	۰/۲۵۳ns	۸	خطا

A: محیط کشت، \*\* در سطح ۰/۰۱ معنی دار است و ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های تعداد ریشه‌چه و دانه رست تشکیل شده در سطح ۰/۰۱ تحت تأثیر محیط‌های کشت (با تبدیل  $\sqrt{X+1/2}$ )

ردیف	تیمار	دانه رست %=X $\sqrt{X+1/2}$
۱	محیط کشت MS تغییر یافته	۴/۹۹a
۲	محیط کشت MS پایه	۰/۷d
۳	محیط تلفیقی پیت/ورمیکولیت	۳/۳۳b
۴	کاغذ صافی مرطوب درون پتری دیش	۱/۹۴c

\* حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

تغییر یافته MS فاقد هورمونهای رشد پس از یک هفته شروع به متورم شدن کردند. ظهور اولین برگها دو هفته پس از کشت رویت شد. در اواخر هفته چهارم ریشه‌چه تشکیل و بعد ساقه‌چه ظاهر شد. پس از انتقال آنها به محیط جدید، رشد و نمو دانه‌رست صورت گرفت (شکل ۱). جهت تجزیه و تحلیل آماری صفات، به دلیل آنکه در بعضی از تیمارها، ریشه‌چه تشکیل نشد و یا اگر هم تشکیل شد منجر به تولید دانه‌رست نگردید، تبدیل داده‌ها جهت دستیابی به پراکنش نرمال ضروری بود. کلیه داده‌ها (X) به صورت  $\sqrt{X+1/2}$  در نرم‌افزار MINITAB وارد گردید. نتایج نشانگر آن است که تأثیر عامل محیط کشت بر صفت تعداد دانه‌رست تشکیل شده معنی‌دار بوده است (جدول ۱). در مقایسه میانگین‌های تعداد ریشه‌چه و دانه‌رست، عامل محیط کشت مؤثر بود و از نظر تعداد دانه‌رست تشکیل شده، محیط تغییر یافته MS به عنوان محیط بهینه جهت کاشت جنین توصیه گردید (جدول ۲). دانه‌رستهای رشد یافته پس از دو ماه جهت انجام سازگاری به گلدانهای حاوی مقادیر (۳:۱:۱) خاک برگ، پرلیت و پیت سترون شده انتقال یافتند و حدود ۳۰ درصد آنها مستقر شدند (شکل ۲).



شکل ۱- رشد و نمو جنین‌های کیکم در محیط کشت بهینه

## بحث

نتایج آزمایشهای انجام شده نشان داد که اعمال پیش تیمار شستشوی مداوم بذرها با آب جاری در شکستن دوره خواب بذر کیکم بسیار مؤثر بوده است. Zhiri (۱۹۹۴) نیز در تحقیقی مشابه بر ریزنمونه‌های سرخدار مؤفق به تولید دانه‌رست از این طریق گردیده است. بنظر می‌رسد تیمار محیط کشت و همچنین پیش‌تیمار انجام شده می‌تواند عامل مؤثر در ایجاد ریشه‌چه و تشکیل دانه‌رستها باشد. Chalupa (۱۹۹۰) طی تحقیقی بر کشت جنینهای جنسی *Quercus ruber* موفق به اخذ بافتهای جنین‌زا و رشد و نمو آنها در محیط کشت MS واجد زغال فعال گردید.

## سپاسگزاری

از همکاران عزیز در زیرگروه کشت بافت گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران بخصوص از آقای دکتر عصاره ریاست محترم مؤسسه به خاطر راهنماییهای ارزشمندشان در پیشبرد طرح و نیز از آقای دکتر قمری زارع رئیس

محترم گروه و سایر همکارانی که در طی انجام این تحقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

## منابع مورد استفاده

- بابائیان، م. ۱۳۸۰. بررسی اوت اکولوژی کیکم در سه منطقه استان فارس (فیروزآباد، سرچهان و سپیدان). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز: ۱۷۸ صفحه.
- ثابتی، ح. ۱۳۵۵. درختان و درختچه‌های ایران. انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، ۷۸۴ صفحه.
- Chalupa, V, 1987. European Hardwood In: Bonga J.M. & Durzan(eds) Cell and Tissue culture in Forestry, vol 3, :Gymnosperms, Angiosperms, Palms, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp: 224-246 .
- Chalupa, V, 1990. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of Oak (*Quercus robur* ) and Linden (*Tilia cordata Mill*). Plant Cell Reports, 9: 398-401.
- Murashige, T and Skooge, F., 1962. A revised Medium for rapid growth and bio- assays with *Tobacco* Tissue Culture. Physiologia plantarum, 15: 473-597.
- Zhiri, A. and Jaziri, M., 1994. Factors affecting the *In vitro* rapid germination of *Taxus* embryos and the evaluation of Taxol content in the plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39: 261-263.

## Regeneration of *Acer cinerasens* through Embryo culture

M. Emam<sup>1</sup>, SH. Shahrzad<sup>1</sup>, T.S. Naraghi<sup>1</sup>, M. Khanhasani<sup>2</sup> and Y., Hamzepoor<sup>3</sup>

1- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran. E-mail: [memam@rifr-ac.ir](mailto:memam@rifr-ac.ir)

2- Research Center of Agricultural and Natural Resources of Kermanshah Province, Iran.

3- Research Center of Agricultural and Natural Resources of Fars Province, Iran.

### Abstract

*Acer cinerasens* is the most important and useful species of Aceraceae. Regarding difficulties in conventional propagation of hardwood plants, specially rooting of cutting in adult *Acer* trees, this study was carried out. To investigate *in vitro* culture of *Acer cinerasens*, seeds were gathered in different seasons from selected mature trees at Sarchahan forest in Shiraz. For culture of mature embryos, seeds were washed with running tap water for 2 days and then surface sterilized with 0.1 % (W/V) mercuric chloride. The embryos were aseptically dissected and transferred in a modified MS medium. Seedling emergence after 4 weeks ranged from 35%. After acclimatization, seedlings were transferred to soil under green house condition. Regarding difficulties in conventional propagation of *Acer*, specially *Acer cinerasens*, this study led to production of plants through embryo culture that will be important.

**Key words:** *Acer cinerasens*, *In vitro* culture and Embryo culture