Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 3, Autumn 2020 (741-751)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.273311.1582

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۱، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۹ (ص ۷۵۱-۷۴۱)

ریز ازدیادی گونه *Lycium depressum*، درختچه بومی ارزشمند قابل استفاده در فضای سبز شهری

لیلا سمیعی[1*]، هما میرشاهی[2]، محبوبه داوودی پهنه کلایی[3] و علی تهرانی‌فر[4]
۱ و ۲. استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳ و ٤. دانشجوی دکتری و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۹)

چکیده

گیاه *Lycium depressum* درختچه‌ای خاردار متعلق به تیره سولاناسه و بومی ایران می‌باشد که قابلیت تحمل بالایی به خشکی و شوری دارد. در این مطالعه دست‌یابی به پروتکل بهینه ریزازدیادی گیاه لیسیوم برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق ابتدا تأثیر هورمون‌های بنزیل آمینو پورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) در ترکیب با نفتالین استیک اسید (NAA) در میزان پرآوری گیاه لیسیوم بررسی شد. سپس اثر ترکیبات آلی و معدنی مختلف شامل میواینوزیتول، کازئین هیدرولیزات، پرولین، آهن FeEDDHA و همچنین کلرید کلسیم بر بهبود پرآوری و کیفیت گیاهچه‌های لیسیوم مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج این آزمایش، محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌عنوان بهترین محیط کشت جهت پرآوری شاخساره شناخته شد. علاوه بر این، افزودن میواینوزیتول تا میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به محیط کشت، تولید شاخساره را در مرحله پرآوری بهبود بخشید و منجر به تولید شاخساره‌های با کیفیت بالاتر و برگ درشت تر گردید. در مرحله ریشه‌زایی نیز بیشترین تعداد و طول ریشه در تیمار ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. نود و پنج درصد ازگیاهچه‌های ریشه‌دار شده به طور موفق در اتاقک رشد سازگار شدند. در مجموع نتایج این تحقیق منجر به دست‌یابی به‌روش بهینه ریزازدیادی درختچه بومی لیسیوم گردید. این دستاورد می‌تواند نقش بسیار مهمی در پیش‌برد انجام تحقیقات گسترده‌تر روی سایر جنبه‌های اهلی‌سازی این گیاه دارویی با ارزش و قابل استفاده در فضای سبز شهری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریزازدیادی، کازئین هیدرولیزات، میو اینوزیتول، FeEDDHA.

Micropropagation of *Lycium depressum*, a promising native shrub for urban landscape

Leila Samiei[1*], Homa Mirshahi[2], Mahboubeh Davudi Pahnehkolayi[3] and Ali Tehranifar[4]
1, 2. Assistant Professor and M. Sc. Student, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3, 4. Ph. D. Candidate and Professor, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(Received: Feb. 08, 2019- Accepted: Apr. 29, 2019)

ABSTRACT

Lycium depressum, a prickly shrub from Solanaceae family, is a native species from Iran with high salinity and drought tolerance ability. In this study, the establishments of an efficient micropropagation method for *L. desressum* was investigated. In the first experiment, the effects of benzylaminoporin (BAP) and thiadiazuron (TDZ) in combination with naphthalene acetic acid (NAA) were investigated. In the second experiment, the effect of various organic and inorganic compounds including myo-inositol, casein hydrolysate, proline, FeEDDHA, as well as calcium chloride on the improvement of proliferation and quality of *in vitro* regenerated shoots were evaluated. According to the results of these experiments, BAP at low concentration (0.5 mg / L) was regarded as the best treatment for *in vitro* proliferation of *L. depressum*. Moreover, the maximum leaf number was achieved in this treatment. In addition, increasing the concentration of myo-inositol to 200 mg/l in MS medium, enhanced shoot proliferation, leaf size and quality of regenerated shoots. The highest root number and length was obtained on full strength MS medium supplemented with 0.3 mg/l IBA. Following rooting, the developed plantlets were hardened and established successfully in culture room with 95% survival rate. Overall, this experiment resulted in an efficient micropropagation protocol for *L. depressum*. The findings of this study can facilitate the path to more extensive research program on various aspects of domestication of this valuable medicinal and landscape species.

Keywords: Casein hydrolysate, FeEDDHA, myo-inositol, proliferation.

* Corresponding author E-mail: samiei@um.ac.ir

مقدمه

لیسیوم با نام علمی *Lycium depressum* Stocks subsp. *depressum* گیاهی است از تیره سولاناسه که در زبان فارسی به آسه و یا دیو خار ترکمنی نیز شهرت دارد (Mozaffarian, 2005). این گیاه مقاومت بالایی به شوری و خشکی دارد و در خاک های عمیق تا نیمه عمیق شور و حتی فاقد شوری در مناطق خشک و نیمه‌خشک پرورش می‌یابد (Mohseni *et al.*, 2017). پراکنش جهانی این گیاه در ایران، ترکمنستان، افغانستان، پاکستان و عراق می‌باشد (Mozaffarian, 2005). جنس لیسیوم دارای ۸۰ تا ۹۰ گونه در سراسر دنیا می‌باشد که ۶ گونه از آن به همراه دو زیر گونه از ایران گزارش شده است (Khatamsaz, 1998). گیاه لیسیوم در طبیعت به فرم درختچه‌ای می‌باشد و تا ارتفاع ۲/۵ متر رشد می‌نماید. برگ‌های این گیاه به شکل مستطیلی و اغلب با نوک کند می‌باشد. جام گل به‌صورت قیفی و به رنگ ارغوانی و طول ۸ تا ۱۲ میلی‌متر می‌باشد. این گیاه در ایران از استان‌های خراسان، گیلان، یزد، فارس و آذربایجان گزارش شده است (Mozaffarian, 2005). در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که برگ‌های گیاه لیسیوم حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدی و فنلی بالا می‌باشد و این گیاه در درمان دیابت فشار خون بالا و مشکلات کلیه مؤثر است (Ghasemi, *et al.*, 2013; Tabaraki *et al.*, 2013). *L. barbarum* از گونه‌های دیگر جنس لیسیوم می‌باشد که دارای خواص دارویی بسیار بالا و شناخته شده ای در دنیا می‌باشد و از آن در تهیه برخی از مکمل های دارویی نیز استفاده شده است (Gong *et al.*, 2018).

درختچه لیسیوم با توجه به دارا بودن ویژگی‌های ظاهری مناسب و قابلیت مقاومت به شرایط خشکی و شوری و همچنین قابلیت هرس‌پذیری بالا می‌تواند کاندید بسیار مناسبی جهت استفاده در فضای سبز شهری باشد. استفاده از گیاهان بومی در فضای سبز به لحاظ این‌که سال‌ها به شرایط اقلیمی زیستگاه خود سازگار شده‌اند و نیاز به مراقبت‌های کمتری در فرایندهای کاشت و نگهداری دارند، اهمیت به‌سزایی در کاهش هزینه‌های احداث و نگهداری فضای سبز دارد. علاوه بر این با توجه به این‌که ایران در اقلیم خشک و نیمه‌خشک قرار گرفته است و با کمبود منابع آبی روبه‌رو می‌باشد، کاربرد چنین گیاهانی در فضای سبز شهری، علاوه بر امکان توسعه بیشتر فضای سبز در شرایط بحرانی کمبود آب، نقش مؤثری در افزایش راندمان مصرف آب و پایداری فضای سبز نیز خواهد داشت.

با وجود پتانسیل‌های بالای گیاه لیسیوم، تا کنون مطالعه‌ای در خصوص امکان تکثیر این گیاه ارزشمند صورت نگرفته است. امروزه روش‌های نوین ازدیاد گیاهان مانند روش ریز ازدیادی جایگزین روش‌های تکثیر کلاسیک شده است و بسیاری از گونه‌های زینتی و دارویی و زراعی از این طریق تکثیر می‌شوند (Esmaeili, *et al.*, 2016; Samiei *et al.*, 2018). از مزایای این روش سرعت و راندمان بالای تکثیر و همچنین دست‌یابی به گیاهان یکنواخت، سالم و عاری از عوامل بیماریزا می‌باشد (Carrillo-Bermejo *et al.*, 2018). از تکنیک کشت بافت تا کنون جهت ریزازدیادی موفق گونه‌های دیگر لیسیوم مانند *Lycium barbarum* (Fira *et al.*, 2016) و *Lycium chinensis* (Maseda *et al.*, 2004) استفاده شده است. در این آزمایش‌ها اندام‌های مختلف گیاه اعم از جوانه، برگ و ریشه به‌عنوان ریزنمونه اولیه استفاده شده است.

گاهی اوقات در طی مراحل تولید گیاهان از طریق ریزازدیادی گیاهچه‌های باززایی‌شده در شرایط کشت بافت ضعیف بوده و از کیفیت بالایی برخوردار نمی‌باشد. یکی از روش‌هایی که می‌تواند منجر به افزایش رشد و کیفیت این گیاهچه‌ها شود، استفاده از برخی مواد مکمل رشد در مراحل مختلف ریزازدیادی می‌باشد که در کنار استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی باعث افزایش کیفیت گیاهچه‌ها و یا افزایش راندمان تکثیر می‌شوند. این مواد می‌توانند شامل ترکیبات آلی مختلف مانند کازئین هیدرولیزات، ال-پرولین و برخی ترکیبات شبه‌قندی مانند میواینوزیتول و همچینین اسیدهای آمینه مختلف باشد. گزارش‌های مختلفی مبنی بر افزایش رشد و راندمان ریزازدیادی گیاهان با استفاده از این مواد ارائه شده است (Bai &

(Qu, 2001; Nas, 2002; Negi & Saxena, 2011). همچنین با توجه به این‌که نیاز گیاهان مختلف به عناصر معدنی موجود در محیط‌های کشت متفاوت می‌باشد، در برخی از تحقیقات نشان داده شده است که تغییر در ترکیب برخی از اجزای محیط کشت منجر بهبود کیفیت گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت گردیده است. از جمله این موارد می‌توان به تغییر در ترکیب آهن، نیتروژن و کلسیم محیط کشت اشاره نمود (Poothong & Reed, 2014; Yadav *et al*., 2003). با توجه به این‌که نتایج آزمایشات اولیه این تحقیق منجر به دست‌یابی به گیاهچه‌های نسبتاً ضعیف گردید که در پاره ای از موارد علایم کلروز برگی را بخصوص در مراحل انتهایی پرآوری نشان می‌دادند، آزمایش‌های تکمیلی جهت بهبود پرآوری و کیفیت گیاهچه‌های لیسیوم با استفاده از ترکیبات مختلف آلی و معدنی صورت گرفت. لذا هدف از انجام این تحقیق دست‌یابی به پروتکل بهینه ریزازدیادی گیاه لیسیوم با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف و همچنین بهبود پرآوری و کیفیت گیاهچه‌های تولیدشده با استفاده از ترکیبات آلی و معدنی مکمل بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این آزمایش از درختچه لیسیوم واقع در محوطه دانشگاه فردوسی مشهد جهت انجام آزمایش‌های ریز ازدیادی استفاده شد. تأیید هویت دقیق این زیرگونه با نام علمی *Lycium depressum* Stock subsp. *depressum* توسط هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت. لازم به ذکر که رویشگاه اصلی این گیاه شهرستان نیشابور واقع در شمال‌غربی مشهد بوده است و این گیاه در سال‌های گذشته به محوطه دانشگاه فردوسی مشهد انتقال یافته بود.

مراحل ضدعفونی

ابتدا شاخساره‌هایی به طول ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۰/۵ سانتی‌متر از شاخه‌های رشد سال جاری در اوایل اردیبهشت ماه تهیه شد و به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس برگ‌های روی شاخه‌ها حذف شده و شاخه‌ها به قطعات به طول ۳ تا ۵ سانتی‌متر هر کدام حاوی ۲ تا ۳ جوانه برش زده شدند و به‌مدت یک ساعت در زیر آب جاری قرار گرفتند. بقیه مراحل ضدعفونی شامل شستشو با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و در نهایت آبشویی با آب مقطر استریل دو بار تقطیر سه بار و هر کدام ۵ دقیقه در زیر هود لامینار صورت پذیرفت.

شرایط کشت

در هنگام کشت، ریزنمونه‌های حاوی یک جوانه جانبی به طول یک سانتی‌متر از قطعات شاخه تهیه شد و در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) بدون هورمون و حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم کشت گردید. لازم به ذکر است که pH محیط کشت قبل از افزودن ۰/۸ گرم بر لیتر آگار با استفاده از HCl و KOH روی ۵/۸ تنظیم گردید و محیط‌های کشت پس از توزین در ویال‌های شیشه‌ای در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۳ بار استریل شدند. پس از کشت ریزنمونه‌ها، شیشه‌های کشت شده در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط نوری ۸/۱۶ ساعت (روشنایی/ تاریکی) با رژیم نوری ۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه به‌مدت یک ماه قرار گرفتند. شرایط اتاق رشد برای تمام آزمایش‌ها یکسان و مشابه شرایط استقرار بود.

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر میزان پرآوری شاخساره در ریزنمونه‌های جوانه جانبی گیاه لیسیوم

در این آزمایش از ریزنمونه‌های جوانه جانبی حاصل از شاخساره‌های رشد یافته از جوانه‌های اولیه در محیط استقرار استفاده شد. ریزنمونه‌های جوانه جانبی به طول ۱ سانتی‌متر تهیه شد و در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آمینو پورین BAP با غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و یا تیدیازورون TDZ با غلظت‌های (۰، ۰/۰۲، ۰/۲، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به‌صورت جداگانه و همچنین هر

کدام در ترکیب با غلظت‌های صفر و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) انتقال یافتند (شکل a-۱ و شکل b-۱). داده‌های آزمایش پس از دو دوره واکشت به فواصل ۳۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات مورد بررسی شامل تعداد شاخه، تعداد برگ و طول شاخه بودند.

ارزیابی اثر ترکیبات آلی و معدنی مختلف در بهبود پرآوری شاخساره در گیاه لیسیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای

این آزمایش پس از اتمام آزمایش قبل و دست‌یابی به تنظیم‌کننده‌های رشد مناسب جهت پرآوری شاخساره گیاه لیسیوم انجام شد. هدف از انجام این آزمایش افزایش کیفیت گیاهچه‌های باززایی شده در مرحله پرآوری بود. در این آزمایش نیز از ریزنمونه‌های جوانه جانبی استفاده شد. جوانه‌های جانبی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و غلظت‌های مختلف مواد آلی و معدنی شامل کازئین هیدرولیزات، میو اینوزیتول، پرولین، کلرید کلسیم و آهن FeEDDHA کشت شدند (جدول ۱). پس از دوبار واکشت ریزنمونه‌ها با فواصل چهار هفته در محیط‌های کشت مشابه فاکتورهای رشد گیاهچه‌ها شامل درصد باززایی شاخساره، تعداد شاخساره، میانگین طول شاخساره و اندازه برگ در گیاهچه‌های پرآوری‌شده ثبت گردید.

جدول ۱. تیمارهای مورد استفاده جهت بهبود پرآوری جوانه‌های گیاه *Lycium depressum* در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 1. Treatments used for improvement of in vitro bud proliferation of Lycium depressum

Treatment code	Treatments
1	0.5 mg/l BAP
2	0.5 mg/l BAP + 200 mg/l myo-inositol
3	0.5 mg/l BAP + 500 mg/l myo-inositol
4	0.5 mg/l BAP+300mg/l Casein hydrolysate
5	0.5 mg/l BAP + 100 mg/l FeEDDHA
6	0.5 mg/l BAP + 1mg/l Proline
7	0.5 mg/l BAP + 600 mg/l CaCl2

ارزیابی قابلیت ریشه‌زایی گیاهچه‌های پرآوری‌شده لیسیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای

در این آزمایش شاخساره‌های پرآوری‌شده از آزمایش قبل از یکدیگر جدا شدند و شاخساره‌هایی به طول ۳ سانتی‌متر انتخاب گردیدند و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون IBA (۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی‌گرم بر لیتر) جهت القای ریشه کشت شدند. پس از گذشت چهار هفته، تعداد و طول ریشه‌ها به‌عنوان پاسخ گیاه به ریشه‌زایی ثبت گردید. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دارشده به آرامی از محیط کشت خارج گردیدند و ریشه‌ها کاملاً با آب شسته شدند تا بقایای محیط کشت کاملاً از روی آنها پاک شود. پس از آن گیاهچه‌ها در بستر کشت حاوی کوکوپیت: پرلیت (۱:۱حجمی: حجمی) که قبلا توسط اتوکلاو استریل شده بود، کشت شدند و در اتاقک کشت نگهداری شدند. به‌منظور پیشگیری از ایجاد تنش رطوبتی در مراحل اولیه سازگاری، سلفون‌های پلاستیکی شفاف روی لیوان‌های پلاستیکی حاوی ریزنمونه‌ها کشیده شد که پس از ۱۰ روز از کشت این پوشش پلاستیکی حذف گردید. در طول این مدت جهت رفع نیازهای تغذیه‌ای، گیاهچه‌ها به طور مرتب و بر اساس نیاز با محیط کشت MS/2 مایع آبیاری گردیدند. پس از گذشت چهار هفته از انتقال گیاهچه به محیط درون‌شیشه‌ای، درصد گیاهان سازگار شده ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش

کلیه آزمایش‌های این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در تمام آزمایش‌ها برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و هر تکرار شامل ۴ ریزنمونه بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون توکی استفاده شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver. 23) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر میزان پرآوری شاخساره در ریزنمونه‌های جوانه جانبی گیاه لیسیوم

براساس نتایج تجریه واریانس تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایش از لحاظ تعداد شاخساره، طول شاخساره و تعداد برگ مشاهده شد (جدول ۲). بررسی مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین تعداد

شاخساره در تیمار هورمونی BAP در مقایسه با TDZ و شاهد به‌دست آمد (جدول ۳). به‌طوری‌که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین تعداد شاخساره (۳/۶) را تولید نمود، درحالی‌که کمترین تعداد شاخساره (۱) مربوط به گیاهچه‌های تحت تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ بود. افزایش غلظت BAP به میزان بیشتر از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر منجر به کاهش تعداد شاخساره شد. همچنین افزودن NAA به تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP منجر به کاهش معنی‌دار تعداد شاخساره از ۳/۶ به ۲/۱ شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه گردید.

تیمارهای آزمایش همچنین تفاوت معنی‌داری با یکدیگر از لحاظ تأثیر بر طول شاخساره نشان دادند. بیشترین طول شاخساره مربوط به تیمار حاوی ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و پس از آن مربوط به تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. کمترین طول شاخه نیز مربوط به تیمار حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ میلیگرم بر لیتر NAA بود. در مجموع طول شاخه با افزایش غلظت BAP و TDZ کاهش پیدا نمود.

اثر تیمارهای هورمونی بر تعداد برگ تولیدشده در ریزنمونه‌های لیسیوم تفاوت معنی‌داری نشان داد. به‌طوری‌که بالاترین تعداد برگ (۱۴/۱) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد هر چند که تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. کمترین تعداد برگ نیز در بالاترین غلظت BAP (۴ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. گیاهچه‌های رشدیافته در محیط کشت حاوی TDZ تعداد برگ کمتری در مقایسه با BAP تولید نمودند هرچند تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف TDZ در تعداد برگ تولیدشده مشاهده نشد.

براساس نتایج این آزمایش تنظیم‌کننده رشد BAP به طور معنی‌داری تعداد شاخساره بیشتری در مقایسه با TDZ در گیاه لیسیوم تولید نمود. تحقیقات نشان داده‌اند که تنظیم‌کننده رشد TDZ در غلظت پایین‌تری در مقایسه با BAP در ریزازدیادی گیاهان چوبی مؤثر می‌باشد (Sujatha *et al*., 2013). منتهی در این آزمایش TDZ در غلظت پایین نیز تأثیر اندکی در مقایسه با BAP بر پرآوری شاخساره گیاه لیسیوم داشت. این نتیجه با یافته‌های دیگر محققین که در آنها به کارایی بالاتر BAP در مقایسه با TDZ اشاره کرده بودند، مطابقت دارد (Ghimire *et al*., 2010; Monney *et al*., 2016). TDZ اگرچه به‌عنوان یک ترکیب شبه سیتوکینینی قوی شناخته شده است اما ممکن است در برخی موارد از تشکیل شاخساره ممانعت نماید و یا منجر به تولید شاخساره‌های غیر طبیعی شود (Preece *et al*., 1991).

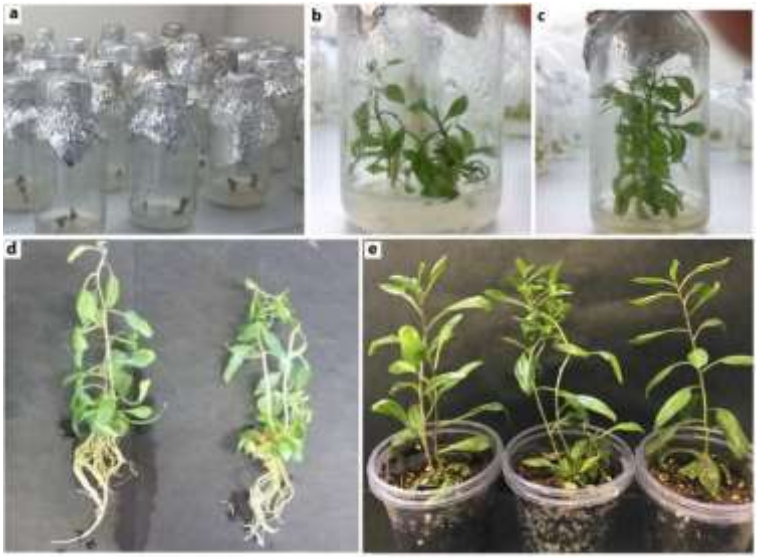
نتایج این آزمایش همچنین نشان داد غلظت پایین BAP (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در مقایسه با غلظت بالای آن (۴ میلی‌گرم بر لیتر) نقش مؤثرتری در افزایش تعداد شاخساره داشت به طوری که با افزایش غلظت BAP تعداد شاخساره و همچنین طول شاخساره به طور معنی‌داری کاهش پیدا نمود. BAP یکی از مؤثرترین سیتوکینین ها در محیط کشت بافت معرفی شده است (Bairu *et al*., 2007) با این حال اثر منفی غلظت بالای این هورمون در پرآوری بسیاری از گیاهان گزارش شده است. نتایج این تحقیق با یافته‌های Fira *et al*. (2016) و Silverstri *et al*. (2018) در رابطه با ریزازدیادی گونه *Lycium barbarum* که غلظت پایین هورمون BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) را به‌عنوان مؤثرترین غلظت این هورمون جهت افزایش تعداد شاخساره معرفی نمودند، مطابقت داشت.

افزودن NAA به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP منجر به کاهش معنی‌دار تعداد شاخساره، طول شاخساره و تعداد برگ شد. در مجموع اضافه نمودن NAA به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP و یا TDZ نتایج متغیری در بر داشت. با این حال بهترین میزان رشد و پرآوری شاخساره گیاه لیسیوم در محیط فاقد NAA مشاهده شد. ترکیب هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به‌عنوان یکی از عوامل تعیین‌کننده رشد و نمو گیاهان شناخته شده است. مقادیر بالای سیتوکینین به همراه مقدار کمی اکسین در بسیاری از موارد اثر سینرژی بر تقسیم سلولی و باززایی درون‌شیشه‌ای گیاهان داشته است (Fatima *et al*., 2011). منتهی در برخی از موارد به‌دلیل بالابودن اکسین داخلی در برخی از گیاهان، افزودن اکسین به محیط کشت می‌تواند اثر منفی

مانند تولید کالوس زیاد در قاعده ریزنمونه و همچنین کاهش رشد را در بر داشته باشد. این نتیجه با یافته‌های Danova *et al.* (2014) مبنی بر عدم مناسب بودن کاربرد NAA در فرایند پرآوری گیاه *Hypericum rumeliacum* مطابقت داشت.

در این مطالعه بالاترین غلظت TDZ (۲ میلی‌گرم بر لیتر) اثر بازدارندگی روی رشد گیاه داشت و گیاهان پس از ۱۰ روز از شروع آزمایش در این تیمار از بین رفتند. به‌نظر می‌رسد که TDZ در غلظت‌های بالا برای گیاه حالت سمیت ایجاد نموده است. بسیاری از تحقیقات گذشته نیز نشان داده‌اند که TDZ در غلظت‌های پایین‌تر اثر مؤثرتری بر میزان پرآوری گیاهان داشته است (Kumar & Reddy, 2010; Lu, 1993). همچنین TDZ در کمترین غلظت (۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر لیتر)، منجر به تولید شاخساره‌هایی با طول زیاد نسبت به شاهد گردید هر چند تفاوت معنی‌داری بین طول شاخساره‌های تولید شده در این تیمار، در مقایسه با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده نشد و با افزایش غلظت TDZ طول شاخساره به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا نمود. این کاهش اندازه طول شاخساره در حضور غلظت‌های بالای TDZ به طور مکرر در سایر گیاهان چوبی نیز گزارش شده است (Hussain *et al*., 2018; Rai *et al*., 2009). تیمار ۰/۰۰۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ اگرچه بلندترین طول شاخساره را ایجاد نمود، منتهی به دلیل این‌که میزان پرآوری شاخساره در این تیمار پایین بود، لذا تیمار مناسبی جهت پرآوری گیاه لیسیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای تشخیص داده نشد.

در مجموع، براساس نتایج این آزمایش کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی گیاه *L. depressum* در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و فاقد هورمون NAA در مقایسه با سایر تیمارهای هورمونی، بهترین تیمار جهت پرآوری ریزنمونه‌ها بود. با این حال گیاهچه‌های تولیدشده در این تیمار از کیفیت قابل قبولی برخوردار نبودند و بنابراین جهت دست‌یابی به گیاهچه‌هایی قویتر و با کیفیت بالاتر انجام آزمایش‌های تکمیلی در این خصوص ضروری به نظر می‌رسید. بر این اساس آزمایش دیگری با استفاده ازنتایج آزمایش اول (استفاده از تیمار هورمونی بهینه) به همراه تیمارهای مختلف مواد آلی و معدنی جهت بهبود پرآوری و کیفیت ریزنمونه‌ها صورت پذیرفت.



شکل ۱. مراحل مختلف ازدیاد درون‌شیشه‌ای گیاه *Lycium depressum*. a) مرحله استقرار ریزنمونه‌ها، b) مرحله پرآوری در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، c) مرحله ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS/2 در شرایط درون‌شیشه‌ای، d) گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت MS/2 حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA، e) گیاهچه‌های سازگار شده پس از گذشت یک ماه از انتقال به شرایط برون شیشه‌ای در اتاقک رشد

Figure 1. Micropropagation stages of *Lycium depressum;* a) Establishment stage. b) Explant's proliferation on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP, c) *In vitro* rooting on MS/2 medium, d) Rooted explants on MS/2 medium containing 0.3 mg/l IBA, e) Established plantlet after one month of transfer to *ex vitro* condition.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخص‌های پرآوری گیاه *Lycium depressum* در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 2. Results of varience analysis effect of combinations of plant growth regulators on *in vitro* proliferation indices of *Lycium depressum*

Source of Variation	df	Means of Square		
		Shoot number	Shoot length	Leaf number
Medium composition	12	2.846**	0.227**	110.598**
Error	65	0.454	0.081	18.556
CV%	-	8.20	12.83	13.11

**: Significantly difference at 1% of probability level. **: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر میزان پرآوری شاخساره در ریزنمونه‌های جوانه جانبی گیاه *Lycium depressum*

Table 3. Mean comparison effect of plant growth regulators on axillary bud proliferation of *Lycium depressum*

Treatment code	BA (mg/l)	TDZ	NAA (mg/l)	Shoot number	Shoot length	Leaf number
1	0	0	0	1.83 bc	0.54 abc	10.83 abc
2	0.5	0	0	3.67 a	0.63 ab	14.17 a
3	0.5	0	0.2	2.17 b	0.20 cd	8.00 bcd
4	1	0	0	1.33 bc	0.38 bcd	11.50 ab
5	1	0	0.2	1.50 bc	0.20 cd	5.50 c-f
6	2	0	0	1.17 c	0.18 cd	2.33 de
7	2	0	0.2	1.50 bc	0.20 cd	1.17 e
8	4	0	0	1.00 c	0.20 cd	1.17 e
9	4	0	0.2	1.50 bc	0.15 d	1.33 e
10	0	0.02	0	1.17 c	0.75 a	5.83 c-f
11	0	0.02	0.2	1.67 bc	0.27 cd	7.50 b-e
12	0	0.2	0	1.83 bc	0.32 bcd	8.67 bcd
13	0	0.2	0.2	1.17 c	0.22 cd	3.50 def

* در هر ستون میانگین هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی دار ندارند.

* In each column means followed by at least a common letter, are not significantly different at 5% probability level.

ارزیابی اثر ترکیبات آلی و معدنی مختلف در بهبود پرآوری شاخساره در گیاه لیسیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایش از لحاظ درصد شاخه‌زایی، تعداد شاخه، طول شاخه و اندازه برگ وجود داشت (جدول ۴). بر اساس نتایج مقایسه میانگین ها بالاترین درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌های جوانه جانبی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و همچنین در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌همراه ۲۰۰ میلی‌گرم میواینوزیتول به‌دست آمد و کمترین میزان باززایی شاخساره مربوط به تیمار حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات بود. محیط‌های کشت حاوی آهن، پرولین، کلرید کلسیم و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول نیز از لحاظ درصد شاخه‌زایی تفاوت معنی‌داری با شاهد (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP) نداشتند (شکل۲).

بیشترین میزان تولید شاخساره به‌ازای هر ریزنمونه (۴/۱) در تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول و پس از آن در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین مشاهد شد که تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. کمترین تعداد شاخساره (۲/۱) نیز در تیمار حاوی پرولین مشاهد شد. لازم به ذکر است در تیمارهای حاوی آهن، کلرید کلسیم و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول نیز میزان تولید شاخساره اندک بود (شکل۲).

طول شاخساره نیز تحت تأثیر تیمارهای مختلف مواد آلی و معدنی قرار گرفت. بالاترین طول شاخساره (۳/۷ میلی‌متر) مربوط به محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول بود که تفاوت معنی‌داری با محیط کشت حاوی آهن نداشت و کمترین طول شاخه در تیمار حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین به‌دست آمد (شکل ۲).

بزرگ‌ترین اندازه برگ در تیمارهای حاوی پرولین و همچنین ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول به‌دست آمد. بقیه تیمارها اندازه برگ کوچک‌تری تولید نمودند که تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند (شکل۲).

در مجموع در این آزمایش، بالاترین تعداد شاخساره، طول شاخساره و بزرگ‌ترین اندازه برگ در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول مشاهده شد.

میو اینوزیتول در واقع یکی ترکیب طبیعی در گیاه است که نقش مهمی در تحریک تقسیم سلول و پروتوپلاست (Kiviharju *et al*., 2005)، انتقال اکسین و جذب و استفاده از یون‌ها (Wood & Braun, 1961) بازی می‌کند. نشان داده شده که استفاده از این ترکیب در محیط کشت بافت، نقش مؤثری در پرآوری شاخساره و افزایش رشد و کیفیت گیاهان دارد (Khvatkov *et al*., 2018; Sarropoulou *et al*., 2015). همچنین این ماده به‌عنوان جایگزین شیر نارگیل که در گذشته به‌عنوان عامل محرک رشد در محیط‌های کشت بافت به‌وفور استفاده می‌شده است، شناخته شده است (Patel *et al*., 2015). نتایج تحقیق حاضر نیز اثر مثبت افزایش میواینوزیتول تا سقف ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت بافت گیاه لیسیوم را تأیید می‌نماید.

گیاهان پرورش یافته در محیط کشت حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات، میزان پرآوری نسبتا بالایی را نشان دادند. مشخص شده است که کازئین هیدرولیزات در بهبود پرآوری شاخساره در برخی از گیاهان چوبی مؤثر بوده است (Debnath *et al*., 2001; Pandey & Tamta, 2014). کازئین هیدرولیزات به‌عنوان یکی منبع نیتروژن آلی، در واقع ترکیبی از کلسیم، فسفات، عناصر میکرو مختلف، ویتامین‌ها و مخلوطی از ۱۸ اسید آمینه می‌باشد (Bhatia & Ashwath, 2008) که این ویژگی‌ها می‌تواند دلیل افزایش پرآوری در گیاه لیسیوم تحت تأثیر کازئین باشد. اگرچه کازئین هیدرولیزات میزان پرآوری را در این گیاه افزایش داد، منتهی به دلیل پایین بودن درصد باززایی گیاهچه‌ها و همچنین کاهش طول شاخساره و اندازه برگ در گیاهچه‌های رشد یافته در این تیمار، انتخاب مناسبی جهت بهبود ریزازدیادی گیاه لیسیوم نبود.

نتایج آزمایش نشان داد که گیاهان پرورش یافته در محیط کشت حاوی آهن FeEDDHA طول شاخه نسبتا بلندتری در مقایسه با شاهد داشتند. اثر مثبت آهن FeEDDHA در افزایش طول شاخساره گیاهچه‌های ریزازدیادی شده گردو و آلو در مطالعات پیشین گزارش شده است (Abay & Pirlak, 2017; Licea-Moreno *et al*., 2015) . آهن نقش مهمی در فرایندهای بیولوژیک گیاه مانند فتوسنتز، سنتز کلروفیل، تنفس، تثبیت نیتروژن و مکانیسم‌های جذب و سنتز DNA دارد. گزارش شده است که FeEDTA به‌دلیل حساسیت زیاد به نور ناپایدار است و همچنین ۴۵ درصد از مقدار اولیه آن در pH=۵/۸ و یا کمتر از بین می‌رود. افزودن FeEDDHA می‌تواند کاهش این آهن را در محیط کشت جبران نماید (Dalton *et al*.,1983). در مطالعه حاضر، اگرچه آهن FeEDDHA نقش مؤثری در بهبود پرآوری شاخساره نداشت، اما توانست طول شاخساره‌های باززایی‌شده را افزایش دهد. احتمال می‌رود که غلظت استفاده‌شده این عنصر در محیط کشت مناسب نبوده است و نیاز به بهینه سازی میزان این عنصر جهت باززایی بهینه گیاه لیسیوم می‌باشد. لذا با توجه به اثر مثبت این نوع آهن در ریزازدیادی بسیاری از گیاهان چوبی، لازم است تأثیر این فاکتور در مطالعات آینده مورد بررسی بیشتری قرار گیرد. بسیاری از محققین به اثر مثبت افزودن آهن FeEDDHA به محیط کشت باززایی گیاهان چوبی مانند *Juglands nigra* (Bosela, Michler & Biology-Plant, 2008)، *Ulmus minor* (Shukla *et al*., 2012) و *Juniperus phonecius* (Loureiro *et al*., 2007) اشاره کرده اند.

ارزیابی قابلیت ریشه‌زایی گیاهچه‌های پرآوری شده لیسیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای

ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌ویژه ریشه‌زایی گیاهان چوبی یکی از مهمترین مراحل ریزازدیادی می‌باشد. در این آزمایش IBA با غظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را در ریشه‌زایی لیسیوم داشت، به‌طوری‌که ۱۰۰ درصد گیاهان در این تیمار ریشه تولید کردند. در ریشه‌زایی شاخساره‌های گونه *L. barbarum* نیز غلظت‌های پایین IBA به‌عنوان غلظت بهینه جهت ریشه‌زایی این گیاه معرفی شد (Silvestri *et al*., 2018). بیشترین تعداد ریشه (۱۱ عدد) و طول ریشه (۳/۶ cm) نیز در این تیمار مشاهده شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در بستر کشت به خوبی سازگار شدند. در مجموع حدود ۹۵ درصد از گیاهچه‌ها با موفقیت سازگار شدند و به گلخانه انتقال یافتند (شکل c-۱ تا e-۱).

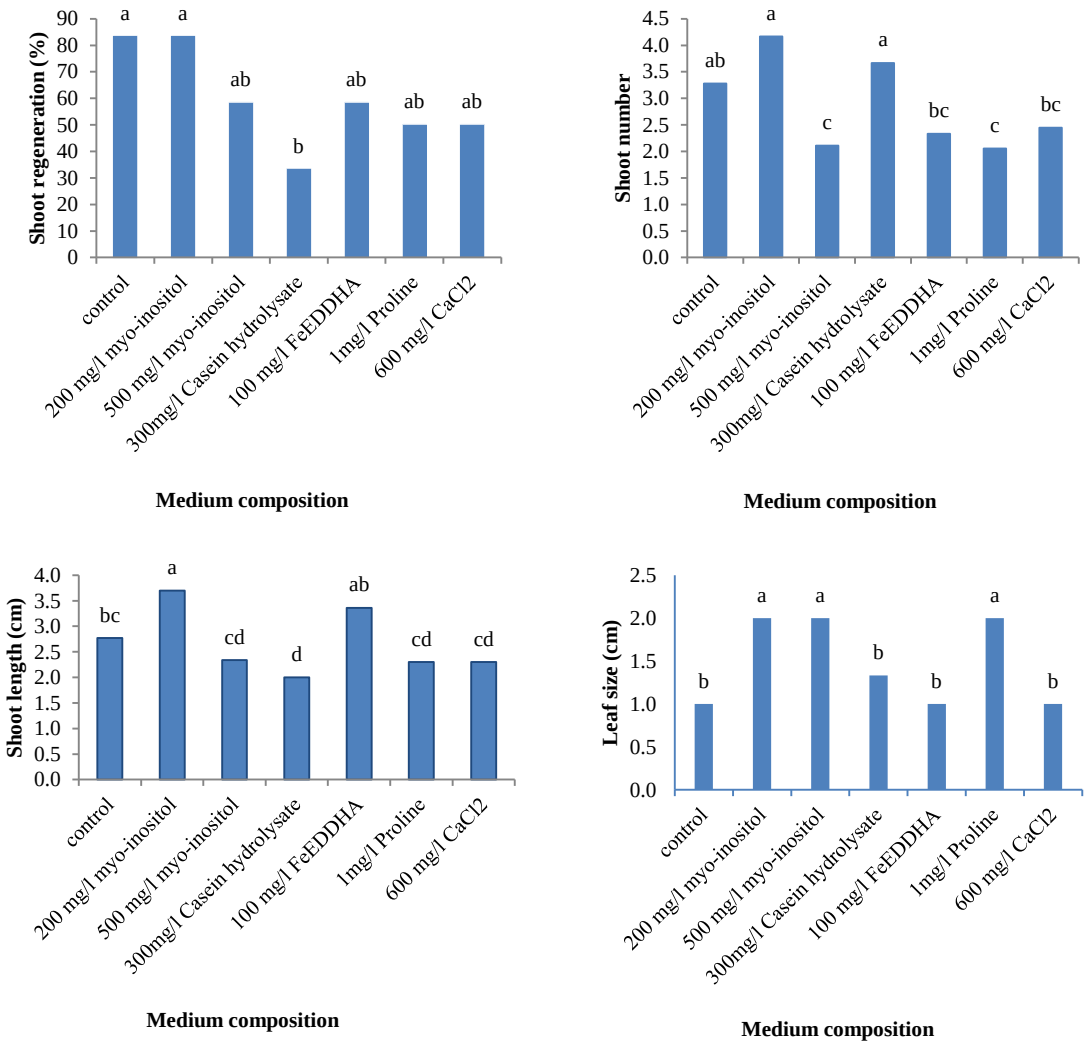
جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر ترکیبات آلی و معدنی مختلف بر شاخص‌های پرآوری گیاه *Lycium depressum* در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 4. Results of varience analysis of organic and inorganic compounds on proliferation indices of *Lycium depressum* *in vitro* condition

Source of Variation	df	Means of Square			
		Shoot regeneration percentage	Shoot number	Shoot length	Leaf size
Medium composition	6	1001.984**	2.095**	1.190**	0.762**
Error	14	327.381	0.351	0.151	0.048
CV%	-	8.33	7.04	10.66	4.87

**: Significantly difference at 1% of probability level.

**: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر ترکیبات آلی و معدنی مختلف بر شاخص‌های پرآوری گیاه *Lycium depressum* در شرایط درون‌شیشه‌ای

Figure 2. Mean comparison effect of various organic and inorganic compounds on proliferation indices of *Lycium depressum*

نتیجه گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق منجر به ارائه پروتکل بهینه جهت ریزازدیادی گیاه لیسیوم گردید. بهترین محیط پرآوری شاخساره برای گیاه لیسیوم محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. آزمایش‌های بعدی نیز نشان داد که جهت افزایش کیفیت شاخساره‌های تولید شده، افزودن میزان میواینوزیتول تا میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت بافت این گیاه ضروری است. همچنین بهترین محیط جهت ریشه‌زایی این گیاه محیط کشت حاوی ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA می‌باشد.

لازم به ذکر است که مطالعه ریزازدیادی گیاه لیسیوم برای اولین بار در این تحقیق صورت گرفته است و تا کنون گزارشی مبنی بر ریزازدیادی این گیاه در ایران و دنیا ارائه نشده است. با توجه به این‌که این گیاه علاوه بر قابلیت بالا جهت استفاده در فضای سبز، خواص دارویی بسیار ارزشمندی نیز دارد، دست‌یابی به‌روش بهینه ریزازدیادی این گیاه، زمینه را جهت انجام آزمایش‌های گسترده تر جهت بهره‌برداری بیشتر از این گیاه بومی با ارزش فراهم می‌نماید.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد از طریق گرنت شماره ۳۸۴۵۰ به انجام رسیده است، که بدینوسیله از مساعدت دانشگاه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abay, S. & Pirlak, L. (2017). Effects of iron sulfate, zinc sulfate, iron chelate, powder sulphur and humic acid applications on vegetative growth of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Erwerbs-Obstbau* 59(1), 71-75.
2. Bai, Y. & Qu, R. (2001). Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. *Plant Breeding*, 120(3), 239-242.
3. Bairu, M.W., Stirk, W.A., Dolezal, K. & Van Staden, J. (2007). Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(1), 15-23.
4. Bhatia, P. & Ashwath, N. (2008). Improving the quality of *in vitro* culture shoots of tomato. *Biotechnology*, 7(2), 188-193.
5. Bosela, M.J. & Michler, C. (2008). Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 44(4), 316-329.
6. Carrillo-Bermejo, E.A., Herrera-Alamillo, M.A., González-Mendoza, V.M., Pereira-Santana, A., Keb-Llanes, M. A. & Castaño, E. (2018). Comparison of two different micropropagation systems of *Saccharum officinarum* L. and expression analysis of PIP2; 1 and EIN3 genes as efficiency system indicators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(2), 399-405.
7. Dalton, C., Iqbal, K. & Turner, D. (1983). Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. *Physiologia Plantarum*, 57(4), 472-476.
8. Danova, K., Čellárová, E., Macková, A., Daxnerová, Z. & Kapchina-Toteva, V. (2010). *In vitro* culture of *Hypericum rumeliacum* Boiss. and production of phenolics and flavonoids. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 46*(5), 422-429.
9. Debnath, S. C. & McRae, K.B. (2001). An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2), 243-249.
10. Fatima, N., Ahmad, N. & Anis, M. (2011). Enhanced *in vitro* regeneration and change in photosynthetic pigments, biomass and proline content in *Withania somnifera* L. (Dunal) induced by copper and zinc ions. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 49(12), 1465-1471.
11. Fira, A., Joshee, N., Cristea, V., Simu, M., Hâr, M. & Pamfil, D., (2016). Optimization of micropropagation protocol for Goji Berry (*Lycium barbarum* L.). *Bulletin UASVM Horticulture*, 73(2).
12. Esmaeili, G., Azizi, M., Aroei, H. & Samiei, L. (2016). Micropropagation of *Astragalus adscendens*: a source of gaz-angabin manna in Iran (Persian manna). *Journal of Agricultural Science and Technology*,18, 741-750
13. Ghasemi, P. A., Momeni, M. & Bahmani, M. (2013). Ethnobotanical study of medicinal plants used by Kurd tribe in Dehloran and Abdanan districts, Ilam province, Iran. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(2), 368-385.
14. Ghimire, B., Seong, E., Goh, E., Kim, N., Kang, W. & Kim, E. (2010). High-frequency direct shoot regeneration from *Drymaria cordata* Willd. leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(2), 209-217.
15. Gong, G., Dang, T., Deng, Y., Han, J., Zou, Z., Jing, S. & Wang, Z. (2018). Physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from *Lycium barbarum* prepared by fractional precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 611-618.
16. Hussain, S. A., Ahmad, N. & Anis, M. (2018). Synergetic effect of TDZ and BA on minimizing the post-exposure effects on axillary shoot proliferation and assessment of genetic fidelity in *Rauvolfia tetraphylla* (L.). *Journal of Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche et Naturali*, 29(1), 109-115.
17. Khatamsaz, M. (1998). *Flora of Iran. Solanaceae, vol. 24*. Research Institute of Forest and Rangelands. (in Farsi)
18. Khvatkov, P., Chernobrovkina, M., Okuneva, A. & Dolgov, S. (2018). Creation of culture media for efficient duckweeds micropropagation (*Wolffia arrhiza* and *Lemna minor*) using artificial mathematical optimization models. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(1), 85-100.

19. Kiviharju, E., Moisander, S. & Laurila, J. (2005). Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 81(1), 1-9.
20. Kumar, N. & Reddy, M. P. (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of Jatropha curcas: a biofuel plant. *Annals of Applied Biology*, 156(3), 367-375.
21. Licea-Moreno, R. J., Contreras, A., Morales, A. V., Urban, I., Daquinta, M. & Gomez, L. (2015). Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(1), 143-154.
22. Loureiro, J., Capelo, A., Brito, G., Rodriguez, E., Silva, S., Pinto, G. & Santos, C. (2007). Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 51(1), 7-14.
23. Lu, C. Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 29(2), 92-96.
24. Maseda, P. H., Lemcoff, J. H., Murúa, M., Frayssinet, N. & Carceller, M. S. (2004). Microcutting culture and morpho-physiological changes during acclimation in two *Lycium chilense* cytotypes. *Biocell*, 28(3), 271-277.
25. Mohseni, N., Sepehr, A., Hoseinzadeh, R. & Golzarian, M. (1395). Effects of adaphic variance on the equilibrium threshold dynamics of the dry ecosystem. *Earth Science Researches* 26, 101-116.
26. Monney, M. A. D., Amissah, N. & Blay, E. (2016). Influence of BA and IBA or NAA combinations on micropropagation of *Cryptolepis sanguinolenta*. *American Journal of Plant Sciences*, 7(03), 572.
27. Mozaffarian, V. (2005). *Trees and shrubs of Iran*. Farhang Moaser Publication. (in Farsi)
28. Nas, M. N. (2004). A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and *in vitro* micropropagation of hybrid hazelnut. *Scientia Horticulturae*, 101(1-2), 189-200.
29. Negi, D. & Saxena, S. (2011). Micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through axillary shoot proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47(5), 604-610.
30. Pandey, A. & Tamta, S. (2014). *In vitro* propagation of the important tasar oak (*Quercus serrata* Thunb.) by casein hydrolysate promoted high frequency shoot proliferation. *Journal of Sustainable Forestry*, 33(6), 590-603.
31. Patel, B., Gami, B., Patel, N. & Bariya, V. (2015). One step pre-hardening micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. *Journal of Phytology*, 7, 1-9.
32. Poothong, S. & Reed, B. M. (2014). Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. *Scientia Horticulturae*, 165, 132-141.
33. Preece, J. E., Huetteman, C. A., Ashby, W. C. & Roth, P. L. (1991). Micro and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(1), 142-148.
34. Rai, M. K., Jaiswal, V. S. & Jaiswal, U. (2009). Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 17(1), 29-38.
35. Samiei, L., Panhehkolayi, M. D., Mirshahi, H. & Karimian, Z. (2018). A simple and efficient micropropagation protocol for new Guinea impatiens (*Impatiens hawkeri*). *Journal of Environmental Biology*, 39(4), 454-458.
36. Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. & Therios, I. (2015). Effects of exogenous indole-3-butyric acid and myo-inositol on *in vitro* rooting, vegetative growth and biochemical changes in leaves and roots in the sweet cherry rootstock MxM 14 using shoot tip explants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27(3-4), 191-201.
37. Shukla, M. R., Jones, A. M. P., Sullivan, J. A., Liu, C., Gosling, S. & Saxena, P. K. (2012). *In vitro* conservation of American elm (*Ulmus americana*): potential role of auxin metabolism in sustained plant proliferation. *Canadian Journal of Forest Research*, 42(4), 686-697.
38. Silvestri, C., Sabbatini, G., Marangelli, F., Rugini, E. & Cristofori, V. (2018). Micropropagation and *ex vitro* rooting of wolfberry. *HortScience*, 53(10), 1494-1499.
39. Sujatha, D., Chithakari, R., Raghuvardhan, L., Prasad, B. & Khan, G. (2013). *In vitro* plantlet regeneration and genetic transformation of sponge gourd (*Luffa cylindrica* L.). *African Journal of Plant Science*, 7(6), 244-252.
40. Tabaraki, R., Nateghi, A. & Ahmady-Asbchin, S. (2013). In vitro assessment of antioxidant and antibacterial activities of six edible plants from Iran. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 6(3), 159-162.
41. Wood, H. N. & Braun, A. C. (1961). Studies on the regulation of certain essential biosynthetic systems in normal and crown-gall tumor cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47(12), 1907-1913.
42. Yadav, M. K., Gaur, A. K. & Garg, G. K. (2003). Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(2), 153-156.