



مقاله پژوهشی"

القای پینه و باززایی لیلکی ایرانی (*Gleditschia caspica* Desf.) در شرایط درون شیشه‌ایمحتبی ایمانی راستابی^۱, سید محمد حسینی نصر^۲, غلامعلی رنجبر^۳ و مصطفی خوشحال سرمست^۴

- ۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
 ۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (توبیستده مسؤول: Smhnasr@sanru.ac.ir)
 ۳- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
 ۴- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
 تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۱ صفحه: ۵۳ تا ۵۳

چکیده مبسوط

مقدمه: لیلکی (*Gleditschia caspica* Desf.) یک از گونه‌های درختی اندمیک جنگل‌های هیرکانی و جزء گونه‌های نادر در دنیا است. چرای برویه، بهره‌برداری بیش از حد میوه برای تلیف دام و عدم استقرار زادآوری در بوم‌سازگان طبیعی، لیلکی را در خطر انقراض قرار داده است. در این پژوهش، شرایط القای پینه و باززایی لیلکی ایرانی تحت تنظیم کننده‌های رشد مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: برای این مغلف، ریزنمونه‌های ساقه، هیپوکوتیل و ریشه از دانه‌های استریل حاصل از بذر تهیه گردید. برای القای پینه از محیط کشت MS حاوی اکسین‌های IBA، NAA و 2,4-D در سطوح غلاظتی ۰/۵، ۱/۵ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و سیتوکین‌های 2ip, TDZ و Kin در غلاظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. برای باززایی از تنظیم کننده‌های رشد TDZ و 2,4-D در غلاظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS استفاده شد. برای ریشه‌زایی از محیط کشت نیم غلاظت MS حاوی IBA با غلاظت یک میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. مشخصه‌های درصد پینه‌زایی، وزن تر و خشک، مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه، رنگ و نوع پینه و منحنی رشد پینه‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین درصد پرآوری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اثر ریزنمونه و نوع تنظیم کننده‌های رشد در سطح ۹۹ درصد بر درصد پینه‌زایی دارای تفاوت معنی‌داری هستند. درصد پینه‌زایی در ریزنمونه ساقه به مراتب بیشتر از هیپوکوتیل و ریشه بود. اثر تنظیم کننده‌های رشد مختلف بر تمامی مشخصه‌های پینه ساقه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد بود. نتایج نشان داد که در بین اکسین‌های مورد مطالعه 2,4-D بیشترین و IBA کمترین درصد پینه‌زایی را داشته است. همچنین در بین سیتوکین‌های مورد مطالعه، Kin کمترین و TDZ بیشترین درصد پینه‌زایی را از خود نشان داد. منحنی رشد وزن تر و خشک پینه نیز نشان از بالا بودن عملکرد رشد پینه در 2,4-D نسبت به دیگر تنظیم کننده‌های رشد داشت. نتایج باززایی نشان داد که میانگین شاخصه‌های ناجا تشکیل شده روی پینه و تعداد شاخه در هر تک پینه به طور قابل توجهی تحت تأثیر ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد است ($P < 0.5$).

نتیجه‌گیری: به طور کلی مطابق نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود که برای باززایی غیرمستقیم لیلکی از محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، پینه‌زایی، سیتوکین، کشت بافت، لیلکی ایرانی

می‌توان تولید درون شیشه‌ای را یکی از راه‌های جایگزین افزایش آن بیان کرد. تشکیل پینه از اندام‌های مختلفی مانند برگ، ساقه و ریشه مرحله مهمی در کشت درون شیشه‌ای است (۶). پینه، توده‌های از سلول‌های پارانتیمی بی‌شکل و تمایز نیافته با دیواره سلولی نازک است که هم در شرایط طبیعی و هم آزمایشگاهی به صورت سازمان نیافته رشد می‌کند (۱۷). پینه‌ها از طریق اندامزایی یا جنین‌زایی روشی قابلیت باززایی و تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند (۶). برای تولید پینه در ریزنمونه‌های گیاهی نیاز به استفاده از تنظیم کننده‌های رشد می‌باشد (۶, ۷, ۱۷).

تاکنون پژوهش‌های فراوانی در زمینه کشت بافت و تعیین مناسب‌ترین تنظیم کننده رشد درختان تیره بقولات انجام شده است. بررسی ریزافزایی^۱ لیلکی ایرانی نشان داد که ریزنمونه‌های ساقه برای باززایی مناسب‌تر از ریشه، کوتیلدون و هیپوکوتیل می‌باشند و استفاده از TDZ برای پرآوری لیلکی ایرانی نتایج مطلوبی به همراه دارد (۳۱). پژوهشی با هدف بهینه‌سازی جنین‌زایی سوماتیکی از ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای برگ لیلکی ایرانی با استفاده از برخی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی انجام شد و نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی از یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵

مقدمه
 بوم‌سازگان هیرکانی یا جنگل‌های شمال ایران یکی از منحصر به‌فردترین بوم‌سازگان‌های دنیا محسوب می‌شود. بوم‌سازگان‌های طبیعی دارای اجزا و عناصر مختلفی هستند که برخی از این عناصر در هیچ بوم‌سازگان دیگری یافت نمی‌شود. لیلکی ایرانی یکی از عناصر اندمیک بوم‌سازگان هیرکانی محسوب می‌شود (۲۶). لیلکی گونه‌ای نادر محسوب می‌شود که به دلیل چرای شدید دام، بهره‌برداری بی‌رویه در خطر انقراض قرار گرفته است (۵) و میزان زادآوری طبیعی آن در جنگل‌ها با خطر مواجه می‌باشد (۱۴). بدون تردید بی‌اهمیت شمردن این گونه ارزشمند آنرا در معرض خطر و به دست فراموشی خواهد سپرد. کما اینکه در پژوهش‌هایی که در این سال‌ها در مورد این گونه چاپ شده هیچ‌گونه اشاره‌ای به خاستگاه طبیعی و اندمیک آن نمی‌شود به طور مثال در پژوهشی روی لیلکی ایرانی انجام شده هیچ اشاره‌ای به اندمیک بودن این گونه نکرده‌اند (۴۰).

درختان جنگلی از تیره بقولات، به دلایل مختلفی مانند قطع بی‌رویه برای توسعه زمین‌های زراعی و چرای دام (۱۴)، طولانی بودن خواب بذر و تکثیر کند و کمتر از طریق جنسی (بذر) (۴۵) دچار کاهش شدید جمعیتی هستند. بر این اساس

شدند. بذرهای ضدغوفنی شده در محیط کشت DKW (۱۵) دارای سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت و دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد درجه سانتی گراد در شرایط درون شیشه‌ای و ۸ ساعت تاریکی با منبع لامپ فلورنس سفید و شدت ۲۵۰۰ لوکس نوری نگهداری شدند.

القای پینه ریزنمونه ریشه، هبیوکوتیل و ساقه پس از گذشت ۲۰ روز، از ریشه، ساقه و هبیوکوتیل گیاهچه‌های بوجود آمده ریزنمونه تهیه شد. برای القای پینه از ریزنمونه‌های یک سانتی‌متری و محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸ درصد آگار حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده گردید. اکسین‌های مورد مطالعه شامل IBA، NAA و ۲,۴-D در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم بر لیتر بودند. همچنین از سیتوکنین‌های TDZ و ۲-ip، BAP و کایتین KIN در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر استفاده گردید. ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت در تاریکی مطابق، در دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد درجه سانتی گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با منبع لامپ فلورنس سفید و شدت ۲۵۰۰ لوکس نوری نگهداری شدند. ریزنمونه‌های اولیه هر ۳۰ روز واکشت شدند. پس از گذشت ۵۰ روز مقایسه بین پینه‌ها در تیمارهای مختلف انجام گرفت. برای مقایسه پینه‌ها مشخصه‌های درصد پینه‌زایی (۳۷)، وزن تر و خشک پینه، مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه، رنگ، نوع (نرم و سفت)، تیپ (همگن و ناهمگن) و واکنش به اندازای اندازه‌گیری شدند (۱۷).

برای رسم منحنی رشد از اکسین و سیتوکنین‌هایی که بیشترین درصد پینه‌زایی را داشتند، ۲۴ قطعه پینه در اندازه و وزن یکسان تهیه شد. وزن اولیه پینه‌ها در زیر هود لامینار اندازه‌گیری شد. سپس هر پینه در یک لوله آزمایشگاه کشت و در زمان‌های نمونه‌برداری ۱، ۴، ۹، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۳ روز، وزن تر و خشک سه قطعه از پینه توزین شد (۲۵). پس از توزین وزن خشک پینه‌ها و مقایسه با وزن تر آن‌ها، منحنی رشد پینه ترسیم شد (۱۷).

اندامزایی از پینه پینه‌های سیز و زرد حاصل از ریزنمونه‌های ساقه به دو الی چهار قسمت تقسیم شدند و به محیط کشت‌های تیمار (جدول ۱) منتقل شدند.

Table 1. Combining growth regulators and their values in the regeneration phase

کد محیط کشت	ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد	کد محیط کشت	ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد
M ₁	MS+ 0.5 mg ⁻¹ 2,4-D + 0/5 mg ⁻¹ TDZ	M ₆	MS+ 1 mg ⁻¹ 2,4-D + 2 mg ⁻¹ TDZ
M ₂	MS+ 0.5 mg ⁻¹ 2,4-D + 1 mg ⁻¹ TDZ	M ₇	MS+ 2 mg ⁻¹ 2,4-D + 0/5 mg ⁻¹ TDZ
M ₃	MS+ 0.5 mg ⁻¹ 2,4-D + 2 mg ⁻¹ TDZ	M ₈	MS+ 2 mg ⁻¹ 2,4-D + 1 mg ⁻¹ TDZ
M ₄	MS+ 1 mg ⁻¹ 2,4-D + 0/5 mg ⁻¹ TDZ	M ₉	MS+ 2 mg ⁻¹ 2,4-D + 2 mg ⁻¹ TDZ
M ₅	MS+ 1 mg ⁻¹ 2,4-D + 1 mg ⁻¹ TDZ		

دمای ± 25 درجه سانتی گراد قرارداده شدند. همچنین پس از ریشه‌زایی، از هر کدام از گیاهچه‌هایی که ریشه و یا پینه ریشه تولید کردند، سه گیاهچه انتخاب و درون ظروف

میلی گرم در لیتر BAP در محیط نیم غلظت MS، بهینه‌ترین ترکیب برای القای پینه از ریزنمونه برگ لیلکی ایرانی است (۴۳). در پژوهشی بهمنظرور ریزا فایی درون شیشه‌ای از از کشت پینه‌های کوتیلیدون گونه لیلکی نتیجه گرفتند که پینه‌های کشت شده روی محیط کشت MS حاوی BAP با بالاترین درصد (۹۴) در غلظت‌های ۰/۲۲ الی ۵ میلی گرم در لیتر TDZ در ترکیب با دو غلظت ۰/۰۵ و دو میلی گرم در لیتر IAA موفق به پینه‌زایی گونه *Acacia magnium* در محیط کشت MS گردیدند (۴۷). در بررسی‌های صورت گرفته روی ساقه، *Taxus baccata* L. سرخدار (۲۲) و *Taxus brevifolia* Nutt. (۲۳) مشخص شد که ریزنمونه ساقه برای تولید پینه مناسب‌تر از دیگر اندام بوده است. همچنین میزان رشد پینه اعم از وزن تر و خشک، درصد و سرعت پینه‌زایی تحت تأثیر ۲,۴-D دارای عملکرد بهتری نسبت به دیگر تنظیم‌کننده‌های مورد مطالعه داشته است. نتایج پژوهشی بر القای پینه گونه کهور پارکیا (Parkia biglobosa Jacq. Benth) ریزنمونه‌های منشاء ساقه در مقایسه با ریشه برای القای پینه عملکرد بهتری دارند (۱). همچنین دریافتند که محیط کشت MS حاوی یک میلی گرم بر لیتر ۲,۴-D منجر به افزایش ۲,۴-D در القای پینه می‌گردد (۱). در مجموع بهنظر می‌رسد که ریزنمونه‌های ساقه در پژوهش‌های انجام گرفته در گونه‌های مختلف پتانسل بالاتری برای القای پینه داشته است. هدف این پژوهش ارزیابی پاسخ القای پینه و بازیابی لیلکی ایرانی در برابر تنظیم‌کننده‌های متفاوت رشد در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. هدف نهایی تحقیق، بازیابی گیاه و جلوگیری از انقراض این گونه ارزشمند اندیمیک است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و محیط کشت

بذرهای لیلکی ایرانی از مرکز بذر درختان جنگلی کلوده آمل تهیه شد. بذر لیلکی دارای خواب فیزیولوژیک است که برای شکستن خواب بذر آن از اسید سولفوریک ۱۰۰ درصد بهمدت ۲۰ دقیقه استفاده گردید. برای ضدغوفنی کردن، بذرها در زیر هود کشت بافت بهمدت ۱۰ دقیقه در کلرید جبوه (HgCl₂) نیم درصد (۳۲) قرار داده شدند و پس از آبشکشی با آب مقطر استریل، به مدت ۰۶ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد تیمار

جدول ۱- ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و مقدار آنها در فاز ساخته‌زایی

ریشه‌زایی و سازگاری گیاه برای ریشه‌زایی اندام‌های بازیابی شده روی پینه از محیط کشت MS + ۵ μM IBA (۳۱) استفاده گردید. کشت‌ها در

نتایج و بحث

درصد پینه‌زایی در ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل
بعد از گذشت ۲۰ روز، پینه‌زایی در ریزنمونه‌ها مشاهد گردید. با توجه به اینکه ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های استریل تهیه شده بود، هیچ گونه آثاری از آلودگی مشاهده نگردید. اما بعد از گذشت ۴۰ روز و پس از زیرکشت اول اندکی قوهای شدن در ریزنمونه‌ها بهویژه در ریزنمونه‌های ریشه مشاهده شد. نتایج درصد پینه‌زایی نشان داد که نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و اثرات متقابل آن‌ها بر درصد القای پینه در سطح خطای یک درصد دارای تفاوت معنی‌داری هستند (جدول ۲).

پلاستیکی حاوی آمیخته خاکی ماسه بادی و خاکبرگ با نسبت مساوی منتقل شدند.

طرح آزمایش و تجزیه و تحلیل داده‌ها

پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل با فاکتورهای تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت با ۴۵ تکرار مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. تجزیه واریانس کلیه داده‌های حاصل از مشخصه‌های اندازه‌گیری شده و مقایسه میانگین تیمارهای مورد آزمایش بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) با استفاده از نرم‌افزار SAS پذیرفت.

بزرگترین سطح مقطع پینه با استفاده از نرم‌افزار Digimizer و پس از تهیه عکس از پینه انجام گرفت.

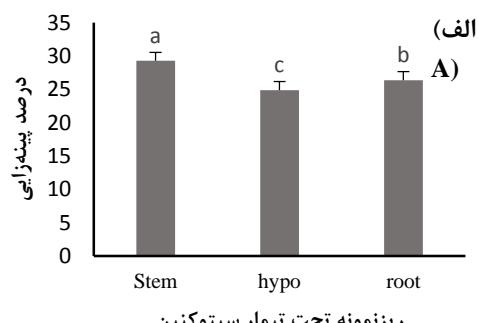
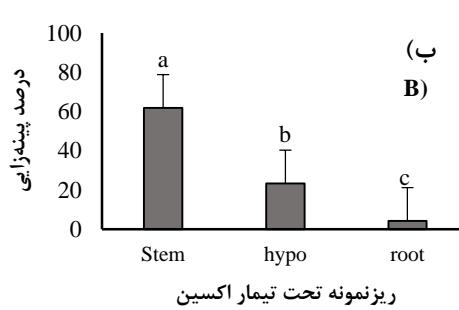
جدول ۲- تجزیه واریانس القای پینه ریزنمونه‌های ساقه، هیپوکوتیل و ریشه تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد
Table 2. ANOVA callus induction of stem, hypocotyl and root explants under the influence of growth regulators

ستوکین		اکسین		منبع تغییرات	
آماره F و معنی‌داری	مجموع مربuat	آماره F و معنی‌داری	مجموع مربuat	آماره F و معنی‌داری	
۴۵۴/۶۰***	۴۱۳۵۶/۲۵	۳	۲۰۳/۲۰***	۹۷۸۳/۸۰	تنظیم‌کننده‌های رشد
۴۶/۳۸**	۳۹۴۶/۲۹	۲	۹/۱۵**	۶۶۱/۱۱	غلظت
۶۵۰/۰۷**	۲۸۱۲/۹۶	۲	۱۲۸۲/۱۴**	۶۱۷۸۱/۰۲	ریزنمونه
۸/۸۵**	۱۶۱۱/۱۱	۶	۳۰/۸۶**	۴۴۵۶/۹۴	تنظیم‌کننده‌های رشد × غلظت
۱۴/۸۴**	۲۷۰۰/۰۰	۶	۳۱/۳۹**	۷۵۵/۷۹	تنظیم‌کننده‌های رشد × ریزنمونه
۶/۴۸**	۲۳۵۹/۷۲	۱۲	۱۰/۲۸**	۲۴۷/۴۵	تنظیم‌کننده‌های رشد × ریزنمونه × غلظت

: معنی‌داری در سطح یک درصد ($P < 0.05$)

در پژوهش‌های مختلف به عملکرد درصد پینه‌زایی بیشتر ساقه نسبت به اندام دیگر گیاه اشاره شده است (۴۶، ۳۱، ۱۱، ۱۹، ۲۲). افزایش سطح زخم یا برش موجب افزایش محیط لایه زاینده یا اپیدرم می‌گردد (۲۰). با افزایش لایه زاینده پیش‌بینی می‌شود که پینه‌زایی بیشتری رخ دهد. دلیل احتمالی پینه‌زایی بهتر ساقه نسبت به ریشه را می‌توان مربوط به افزایش سطح زخمی در سطح مقطع بریده شده ساقه دانست که منجر به جذب بیشتر عناصر غذایی و تنظیم کننده‌های رشد (۱۷) از محیط کشت می‌شود.

اثر نوع ریزنمونه به کار رفته در این پژوهش بدون توجه به نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد بر روی درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌های حاصل از دانه‌ال لیلکی در شکل ۱ آمده است. ریزنمونه‌های ساقه تحت تأثیر اکسین، با میانگین ۶۱/۸ درصد و ریزنمونه‌های ریشه با میانگین ۴/۳ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان پینه‌زایی را به خود اختصاص دادند. همچنین ریزنمونه ساقه با میانگین ۲۹/۴ درصد، بیشترین درصد پینه‌زایی و ریزنمونه‌های هیپوکوتیل با میانگین ۲۴/۳ درصد کمترین درصد را تحت تأثیر ستوکین‌های مختلف نشان داد.



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد پینه‌زایی برای اساس تنظیم‌کننده‌های رشد، ستوکین (الف) و اکسین (ب).

Figure 1. Mean comparison of based on growth regulators, cytokinin (A) and auxin (B)

به اثر متقابل ریزنمونه‌های ریشه و هیپوکوتیل در غلظت و تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۲)، بهدلیل جلوگیری از فاصله‌گیری از هدف تحقیق، مورد مطالعه قرار نگرفت.

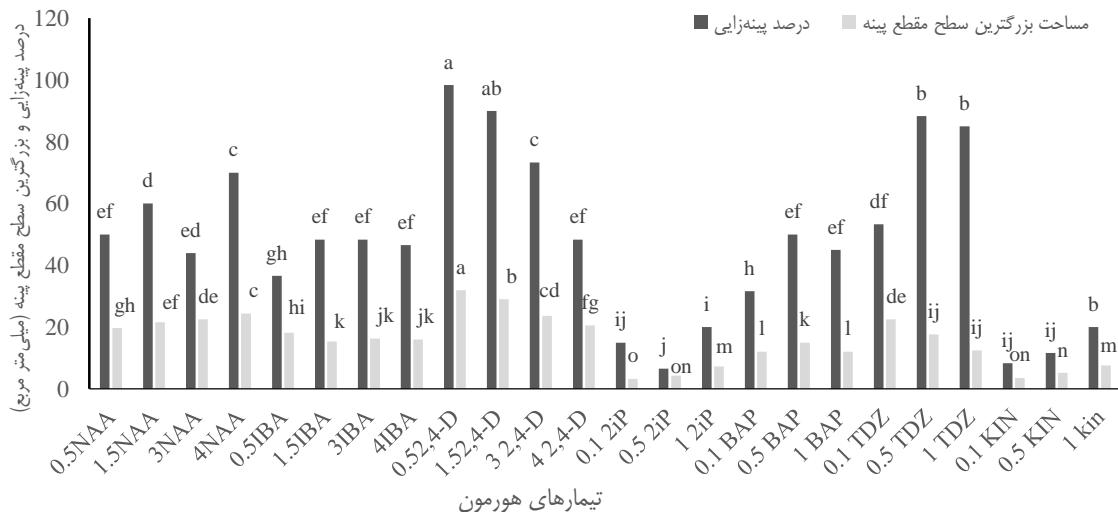
القای پینه در ریزنمونه ساقه لیلکی ایرانی با توجه به نتایج به دست آمده مبنی بر درصد پینه‌زایی بیشتر ریزنمونه ساقه نسبت به ریشه و هیپوکوتیل (شکل ۱)، تمرکز پژوهش بر ریزنمونه ساقه قرار گرفت و جزئیات نتایج مربوط

میکرومول پرآوری مشاهده شد. نتایج تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف بر مشخصه‌های درصد پینه‌زایی، مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه، وزن تر و خشک پینه در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان از تفاوت معنی دار در اثر تنظیم‌کننده‌های رشد در تمامی مشخصه‌های مورد مطالعه پینه در سطح خطای یک درصد دارد. نتایج مقایسه میانگین درصد پینه‌زایی و مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف در شکل ۲ آمده است. نتایج نشان داد که ۲,4-D در غلظت نیم میکرومول با میانگین ۹۸/۳ درصد بیشترین و Kin در غلظت نیم میکرومول با میانگین ۶/۶ درصد کمترین میانگین درصد پینه‌زایی را داشتند. به طور کلی در بین اکسین‌های مورد مطالعه، ۲,4-D در غلظت‌های مختلف بیشترین و کمترین درصد پینه‌زایی را نشان داد. در بین سیتوکینین‌های مورد مطالعه، Kin کمترین و TDZ بیشترین درصد پینه‌زایی به مانند BAP را از خود نشان داد. در ابتدا انتظار می‌رفت که BAP به بسیاری از پژوهش‌ها (۱۱، ۲۱، ۲۲) از دیگر سیتوکینین‌ها درصد پینه‌زایی بیشتری را نشان دهد. اما نتایج پژوهش نشان از برتری TDZ نسبت به دیگر سیتوکینین‌های مورد مطالعه در مشخصه‌های پینه‌زایی بود. دلیل این امر را می‌توان به سرشت و حساسیت گونه‌های گیاهی نسبت به BAP مرتبط دانست (۱۶). البته به عملکرد بهتر TDZ برای القای پینه تیره بقولات نیز اشاره شده است (۹).

مقایسه میانگین مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه نشان داد که ۲,4-D در غلظت ۰/۵ میکرومول در لیتر، به میزان ۳/۱۹ سانتی‌متر مربع، بیشترین سطح مقطع پینه را در بین اکسین‌های مورد مطالعه ایجاد کرد. TDZ در غلظت ۰/۱ میکرومول بر لیتر، بیشترین میانگین را بین سیتوکینین‌های مورد مطالعه نشان داد (شکل ۲).

بعد از گذشت ۵۰ روز، پینه‌های تولید شده از ریزنمونه ساقه، رنگ، نوع و واکنش متفاوتی از خود نشان دادند. پینه‌های تولید شده در تمامی ریزنمونه‌هایی که پینه تولید کرده بودند در روزهای اولیه، به رنگ سفید متمایل به خاکستری با ظاهری نیمه شفاف مشاهده شدند. بعد از گذشت ۳۰ روز از تاریخ کشت، توده ترد و نرم پینه در ریزنمونه اولیه قابل تفکیک از پینه‌های سفت‌تر بود. به طور کلی تنظیم‌کننده‌های Rشد ۲iP NAA و ۲iP Kin پینه‌های همگن و یا نسبتاً همگن تولید کردند و تنظیم‌کننده‌هایی رشد دیگر پینه‌هایی با بافت ناهمنگ ایجاد کردند. همچنین در تنظیم‌کننده‌های Rشد ۲iP IBA و ۲iP TDZ پینه‌های سفت و یا به نسبت سفت‌تر مشاهده شد. از نظر رنگ، پینه‌های تولید شده بیشتر دارای رنگ سفید و سبز بودند ولی در تنظیم‌کننده‌های Rشد تیره مشاهده گردید. پینه‌ها معمولاً به رنگ سفید یا سبز هستند (۲۵، ۲۷). نتایج رنگ پینه‌ها نشان از تنوع رنگی پینه تولید شده در تنظیم‌کننده‌هایی رشد مختلف بود. این تنوع رنگ را می‌توان به دلیل حضور رنگیزه‌های آنتوسیانین (۱۸)، که حاصل سنتز و تعامل بیچیده با هورمون‌های گیاهی هستند (۲۷)، بیان کرد. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در غلظت‌های مختلف انواع متفاوتی از پینه از نظر شکل، اندازه و رنگ را تولید می‌کنند. نتایج نشان داد که بیشتر پینه‌ها، تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه ساختار ناهمگنی دارند. وجود گرادیان مواد غذایی، مواد تنظیم‌کننده رشد و گازها بین توده سلول‌های پینه، منجر به غیریکواختی پینه‌ها با یک دیگر می‌شود (۲۵).

نتایج اولیه درصد و مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه نشان داد که ۸۹/۸ درصد ریزنمونه‌های ساقه تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه، پینه تولید کردند. در پینه‌های متأثر از NAA در غلظت ۰/۵ میکرومول، IBA در غلظت سه و چهار میکرومول و ۲,4-D در غلظت چهار

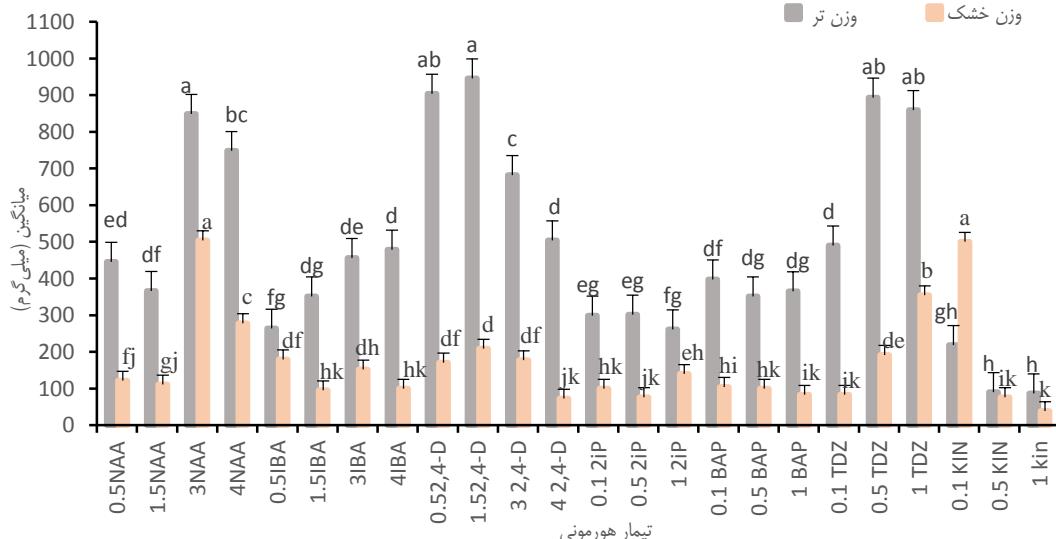


شکل ۲- آزمون مقایسه میانگین درصد پینه‌زایی و مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه بر اساس اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و سطح غلظت بر ریزنمونه ساقه. حروف روی ستون هر مشخصه مورد مطالعه به صورت مجزا از مشخصه دیگر در نظر گرفته شده است

Figure 2. Mean comparison of the callus induction percentage and largest cross-sectional area of the callus based on the growth regulators and concentration levels Interactions on the of stem explants. The words on each column related to each characteristic are considered separately from other characteristics

تأثیر بازدارندگی 2,4-D با افزایش غلظت در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است (۳۴،۳). این اثر بازدارندگی 2,4-D در غلظت‌های بالا تا حد زیادی مربوط به اثر علف‌کشی این تنظیم‌کننده رشد می‌باشد (۲). به طور کلی 2,4-D و TDZ در سطوح غلطی مختلف دارای راندمان بالاتر از ۶۰ درصد پینه‌زایی بودند.

2,4-D به طور گسترده برای تولید و حفظ پینه استفاده می‌شود (۸) و در تحقیقات زیادی مشاهده شد که 2,4-D بهترین و معمول‌ترین اکسین به منظور تولید پینه در تک لپهای‌ها و حتی در دولپهای‌ها می‌باشد (۳۵،۱۰،۲۷). TDZ شبیه سایتوکنین موثر در کشت بافت گونه‌های چوبی می‌باشد (۳۳). بنظر می‌رسد رابطه معکوس بین درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌های ساقه لیلکی ایرانی و غلظت 2,4-D وجود دارد.

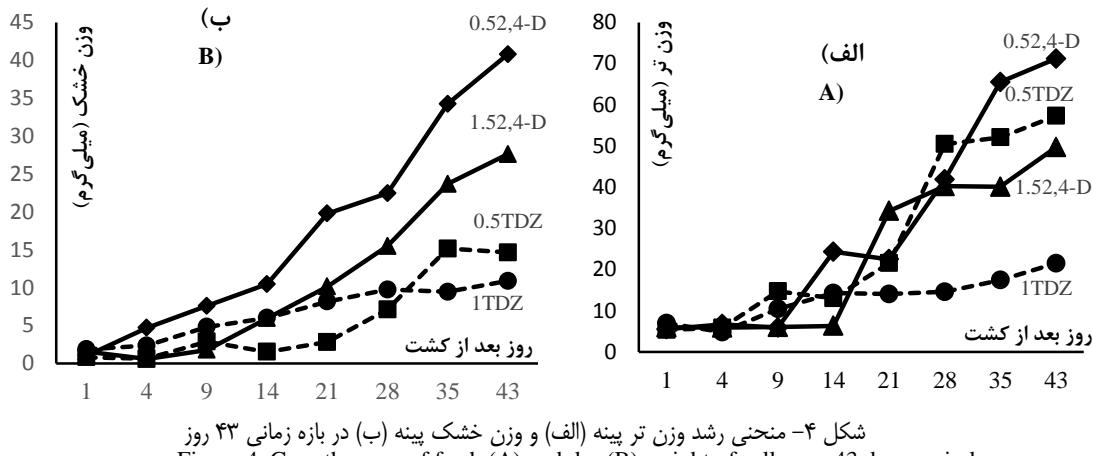


شکل ۳- آزمون مقایسه میانگین وزن تر و خشک بر اساس اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و سطح غلظت بر ریزنمونه‌های ساقه. حروف روی ستون مربوط به هر مشخصه، به صورت مجزا از مشخصه دیگر در نظر گرفته شده است

Figure 3. Mean comparison of the fresh and dry weight based on the growth regulators and concentration levels. Interactions on the stems explants. The words on each column related to each characteristic are considered separately from other characteristics

می‌شود (۲۸). نوع سیتوکینین به کار گرفته در محیط کشت در میزان بازیابی و قدرت رشد گیاهان بازیابی شده تأثیرگذار است و از اساسی‌ترین عوامل مؤثر بر موفقیت در کشت بافت باشد. در ارتباط با سیتوکینین‌های مورد مطالعه، ریزنمونه‌هایی که در تماس با TDZ بودند در مقایسه با BAP تولید و تکثیر پینه بیشتری از خود نشان داده و حتی از وزن تر و خشک بالاتری برخوردار بوده‌اند. این نتایج با یافته‌های (۲۶) در رابطه با استفاده از TDZ برای تولید پینه در گونه *Arbutus unedo* و همچنین با نتایج (۴۱) بر روی *Jatropha curcas* مطابقت دارد. علت این پاسخ مناسب ریزنمونه‌های ساقه به پینه‌زایی مرتبط با خصوصیت خاص TDZ است. اگرچه TDZ در گروه سیتوکینین‌ها قرار می‌گیرد، ولی یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد آن بروز همزمان اثر اکسینی و سیتوکینینی است، این در حالی است که از نظر ساختاری کاملاً متفاوت از اکسین‌ها می‌باشد (۲۸).

مقایسه میانگین وزن تر و خشک پینه برای تیمارهای مورد مطالعه در شکل ۳ آمده است. نتایج نشان داد که 2,4-D در غلظت‌های $1/5$ و $1/5$ میکرومول در لیتر، به ترتیب به میزان ۹۰۴ و ۹۰۴ میلی‌گرم بیشترین وزن تر را در میان دیگر اکسین‌های به کار رفته داشتند. از بین سیتوکینین‌های مورد مطالعه نیز، TDZ در غلظت یک میکرومول با میانگین ۸۴۶ میلی‌گرم بیشترین وزن تر را نشان داد. نتایج مقایسه میانگین وزن خشک پینه نشان داد که NAA در غلظت سه میکرومول بر لیتر، به میزان $304/4$ میلی‌گرم بیشترین وزن خشک را در میان دیگر اکسین‌ها داشت. از بین سیتوکینین‌های مورد مطالعه نیز، TDZ در غلظت یک میکرومول بر لیتر با میانگین $254/3$ میلی‌گرم بیشترین وزن خشک را نشان داد. وزن تر و خشک پینه به طور گسترده به عنوان معیاری از رشد پینه‌ها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. در پژوهشی بیان شده است که سطوح زیاد TDZ باعث تحریک پینه‌زایی

شکل ۴- منحنی رشد وزن تر پینه (الف) و وزن خشک پینه (ب) در بازه زمانی ۴۳ روز
Figure 4. Growth curve of fresh (A) and dry (B) weight of callus on 43 days period

و شکل‌های مختلف، در کلیه ریزنمونه‌های مورد بررسی، شروع پینه‌دهی و رشد آنها دارای سرعت نسبتاً بالایی بود. بنابراین بررسی منحنی‌های رشد نیز نتایج قبلی این پژوهش را در ارتباط با وزن تر و خشک پینه را تأیید می‌کند به طوری که منحنی‌های مذکور نشان می‌دهند که رشد پینه ریزنمونه‌های ساقه، تحت تأثیر ۴-D ۲، بیش از سایر اکسین‌ها می‌باشد. آنچا که وزن تر و خشک گیاه به عنوان تابعی از زمان، به عنوان اساسی ترین اطلاعات برای آنالیزهای رشد مطرح است (۳۰). پیش‌بینی می‌شد که با گذشت زمان، ریزنمونه‌ها تحت تأثیر اکسین ۲,4-D ۲ رشد بیشتری داشته باشند. زیرا ۴-D ۲، محرك قوي برای ایجاد و رشد پینه محسوب می‌شود (۳۵,۳۹,۱۰).

اندامزایی، ریشه‌زایی و سازگاری گیاه‌چه لیلکی ایرانی بعد از گذشت دو هفته از انتقال پینه‌های ساقه به محیط کشت بازیابی، پینه‌ها به رنگ سبز تمایل شدند. نتایج تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر بازیابی پینه بعد از گذشت شش ماه در جدول ۶ آمده است. نتایج نشان داد که میانگین شاخه‌های نابجا تشکیل شده روی پینه و تعداد شاخه در هر تک پینه به طور قابل توجهی تحت تأثیر ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفت ($P < 0.5$).

سیتوکینین‌ها موجب تقسیم سلولی شده و رشد و تشکیل پینه را سبب می‌شوند (۱۲). TDZ شبیه سیتوکینین مؤثر در کشت بافت گونه‌های چوبی می‌باشد (۱۳) و تأثیر آن بر القای اندامزایی، ساقه‌زایی، پینه‌دهی و تولید شاخه‌های نابجا در بسیاری تحقیقات مطرح شده است (۳۳,۳۷,۴۴) استفاده از TDZ در کشت گیاهان سخت‌کار بومی مثل *Robinia pseudoacacia* که همانند لیلکی از تیره بقولات می‌باشد، مؤثر بوده است (۹). یکی از دلایل احتمالی اثر مثبت TDZ در القا و بازیابی پینه می‌تواند مربوط به تعديل نمودن غلظت بالای اکسین درون ساقه لیلکی ایرانی باشد. هر چند که این موضوع باستی با اندازه‌گیری میزان اکسین درون ساقه این گیاه نسبت به ریزنمونه‌های دیگر ثابت شود.

در شکل ۴ منحنی رشد وزن تر و خشک پینه ارائه شده است. نتایج نشان داد که با گذشت زمان، وزن تر و خشک پینه‌ها در همه تیمارها افزایش داشته است. روند رشد وزن تر و خشک پینه در تیمار D-2,4-D در غلظت نیم میلی گرم بر لیتر بعد از گذشت ۴۳ روز بیشتر از دیگر تیمارها بود. همچنین تیمار نیم میلی گرم با اینکه وزن تر بالایی داشته اما بعد از گذشت ۴۳ روز آب زیادتری نسبت به دیگر تیمارها از دست داده است. در این پژوهش ضمن تشکیل پینه‌هایی با رنگ‌ها

جدول ۴- تجزیه واریانس نوع تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخه‌ای

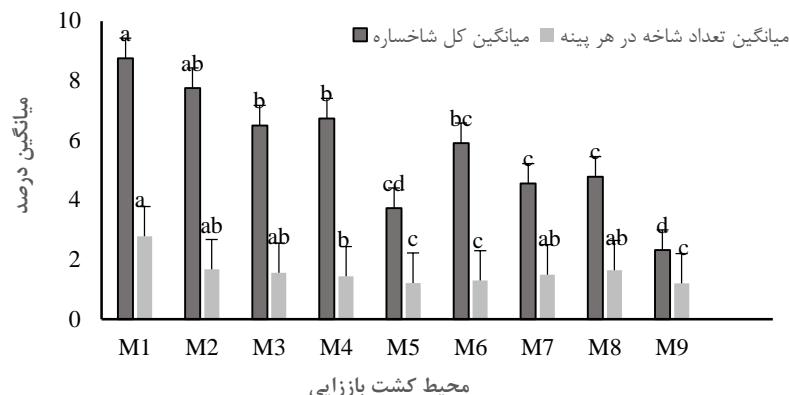
Table 4. ANOVA of various of growth regulators on shoot induction

درصد تعداد شاخه پینه		درصد شاخه‌ای		منبع تغییرات	
آماره F و معنی داری	میانگین مربعات	آماره F و معنی داری	میانگین مربعات	درجہ آزادی	تنظیم‌کننده رشد
۵/۷۸*	.۰/۸۲۱	۴/۲۹**	۸/۳۲۳	۸	خطا
	.۰/۱۴۲		۱/۹۴۵	۲۷	

*: معنی داری در سطح یک درصد ($P < 0.5$)

کاسته می‌شود. البته افزایش تعداد شاخه در غلظت‌های بالای دو تنظیم‌کننده رشد بهویژه در محیط M_8 و M_7 مشاهده گردید. اما اندام ایجاد شده بی‌شكل و غیر عادی بودند که با گذشت زمان رشد نداشتند. بنابراین به طور کلی استفاده از محیط M_1 برای بازیابی پینه پیشنهاد می‌شود.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از میان ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف، ترکیب M_1 بیشترین پرآوری را با میانگین ۸/۷۵ داشت. همچنین درصد تعداد شاخه‌های تولید شده در هر پینه دارای میانگین ۲/۷۸ بود (شکل ۵). بهنظر می‌رسد با افزایش غلظت ۲,4-D و TDZ از میزان پرآوری



شکل ۵- مقایسه میانگین پرآوری تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد. حروف روی ستون مربوط به هر مشخصه، به صورت جدا از مشخصه دیگر در نظر گرفته شده است

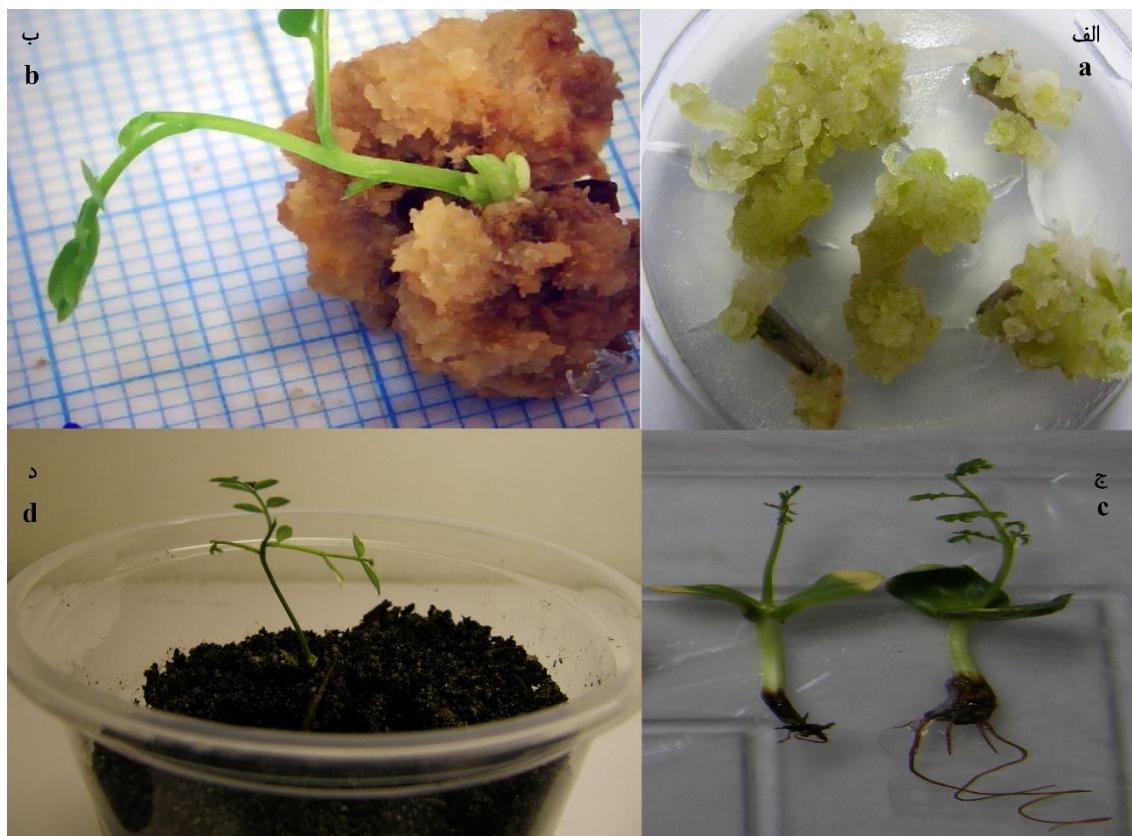
Figure 5. Mean comparison shoot induction under the influence of growth regulators. The words on each column related to each characteristic are considered separately from other characteristics

طولی بودند. میزان موفقیت در مرحله سازگاری بیش از ۶۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش ترکیب بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد و مناسب‌ترین ریزنمونه برای القای پینه و بازیابی لیلکی ایرانی در شرایط درون شیشه‌ای پیشنهاد می‌شود. اگر هدف تنها القای پینه باشد می‌توان از MS + 0.5 mg/l 2,4-D و در صورت دسترسی از محیط MS + 0.5 mg/l TDZ استفاده کرد. اگر هدف بازیابی شاخساره لیلکی به روش غیرمستقیم باشد ترکیب MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l TDZ نتایج مناسبی خواهد داشت. نظر به اینکه در اکثر روش‌های انتقال ژن به گیاهان، القای پینه و بهینه‌سازی اندامزایی از آن بسیار حائز اهمیت است، بنابراین، روش درون شیشه‌ای گزارش شده در این مقاله می‌تواند تا حد زیادی مسیر انتقال ژن به این گونه گیاهی را در راستای بهبود مقاومت این گونه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی هموار نموده و از انفرض این گونه ارزشمند جلوگیری نماید.

حضور اکسین و سیتوکینین در تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول‌های گیاهی الزامی است (۴۲). در کشت سلول و بافت گیاهی، علاوه بر نوع تنظیم‌کننده رشد، غلظت و روابط متقابل بین آن‌ها نیز تاثیر گذار است (۳۶). در این تحقیق استفاده تأمیم از 2,4-D و TDZ بر اندامزایی از روی پینه و تداوم رشد پینه‌های ساقه لیلکی ایرانی مؤثر بود. نتایج اولیه نشان داد که در همه تنظیم‌کننده‌های رشد به کار رفته، بازیابی مشاهده گردید. (۳) نتیجه گرفته شد که استفاده از 2,4-D و TDZ تأثیر بسیار زیادی در تولید پینه و شکل‌زایی (مورفوژن) آن دارد. با توجه به مقایسه میانگین بازیابی پینه (شکل ۵)، با افزایش غلظت 2,4-D، به طور نسبی از میانگین بازیابی و تعداد شاخه کاسته شده است. با توجه به تأثیر بیشتر اکسین‌ها در تولید اندام هوایی گیاهان (۳۴، ۲۴، ۳) بیشینی می‌گردید که بازیابی پینه لیلکی ایرانی بیشتر متأثر از تعییر غلظت 2,4-D باشد. بعد از تولید ریشه، گیاهچه‌ها به گلدان حاوی حاوی آمیخته خاکی ماسه بادی و خاکبرگ (شکل ۶) انتقال داده شده و در یک اتاقک با شرایط کنترل شده نسبی نگهداری شدند. پس از گذشت ۳۰ روز از انتقال گیاهچه‌ها بعضی از آنها دارای رشد



شکل ۶- القای پینه ساقه لیلکی (الف)، اندام زایی (ب)، ریشه‌دار کردن گیاهچه (ج) و سازگاری گیاهچه لیلکی (د)

Figure 6. Induction of lilac stem callus (a), organogenesis (b), seedling rooting (c) and lilac seedling compatibility (d)

منابع

- Abbas, M.S., H.M. El-Shabrawi, A.S. Soliman and M.A. Selim. 2018. Optimization of germination, callus induction, and cell suspension culture of African locust beans *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(1): 191-201.
- Ahari Mostafavi, H., H. Fathollahi, B. Naserian, F. Majd, H. Rahimian, A. Ghanbari and M. Minbashi. 2002. Determination of the best application time of 2,4-D C-labelled herbicides and C-labelled glyphosate for translocation to root system of *glycyrrhiza glabra* at vegetative growth stage. Journal of Nuclear science and technology, 1(28): 29-33 (In Persian).
- Ahmadi, E., S.M.H. Nasr and H. Jalilvand. 2013. Callus Induction and Plant Regeneration from Node Explants of *Ziziphus Spina-Christi*. Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology, 1(1): 9-16.
- Arikat, N.A., F.M. Jawad, N.S. Karam and R.A. Shibli. 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Scientia Horticulturae, 100(1-4): 193-202.
- Asadi, M. 1998. Autecology, seed germination ecophysiology and chemical analysis of different parts of fruit in *Gleditsia caspica* Desf. Master Thesis, Faculty of science, University of shahid Beheshti, 133 pp (In Persian).
- Bagheri, A., A. Sharifi and N. Moshtaghi. 2010. Applied plant tissue culture. 1sd edn, Mashhad University Jihad Press, Mashhad, Iran, 480 pp (In Persian).
- Burklin, V.B., I.R. Moleva, L.H. Filonova, V.P. Grakhov, Y.B. Blume and P.V. Bozhkov. 1996. Proliferative activity of callus cultures of *Taxus baccata* L. in relation to anticancer diterpenoid taxol biosynthesis. Biotechnology Letters, 18: 1309-1314.
- Castillo, AM., B. Egana, J.M. Sanz, L. Cistue. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Rep, 17: 902-906.
- Chalupa, V. 1987a. Effect of bezylaminopurine and thidiazuron on *invitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. Biol. Plant, 29: 425-429.
- Chee, PP. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. Hort. Sci, 25: 792-793.
- Debnath, M. 2008. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. Journal of Medicinal Plants Research, 2(2): 45-51.

12. DeKlerk, G.J. 2006. Plant hormone in tissue culture. *Plant Cell and Tissue Culture Phytopathology Biochemical*, 17-25.
13. Del Monte, J.P. and A.M. Tarquis. 1997. The role of temperature in the seed germination of two species of the *Solanum nigrum* Complex. *J. Exp. Bot.*, 48: 2087-2093.
14. Dewan, A., K. Nanda, S.G. Gupta. 1992. In vitro micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. Indica Brenen via cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep.*, 12: 18-21.
15. Driver, J.A. and A.H. Kuniyuki. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4): 507-509.
16. Ebrahimie, E., A.A. Habashi, M. Mohammadie-Dehcheshmeh, M.R. Ghannadha, B. Gharevazie and B. Yazdi-Amadi. 2006. Direct shoot regeneration from mature embryo as a rapid and genotypeindependent pathway in tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (*Cuminum cyminum* L.) genotypes. *In Vitro Cell. Dev. Biol-plant*, 42(5): 455-460.
17. Esna-Ashari, M. and M.R. Zokaei-Khosroshahi. 2013. Comprehensive guide to plant tissue culture. Bu-Ali Sina University press, 474 pp (In Persian).
18. Evans, D.E., J.O. Coleman and A. Kearns. 2003. Plant cell culture. Garland Science, 194 pp.
19. Fatima, Z., A. Mojib, S. Fatima, A. Arshi and S. Umar. 2009. Callus induction, biomass growth and regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh: influence of plant growth regulators and carbohydrates. *Journal of Biotechnology*, 33: 1-13.
20. Gangulee, H.C., K.S. Das, C. Datta and A.K. Kar. 1972. College botany. New Central Book Agency
21. George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology (No. Ed. 2). Exegetics limited.
22. Ghafoori, R., F. Bernard, Sh. Abolmaali and A. Mousavi. 2012. Improve effect of glutathione on the induction and growth of *Taxus baccata* L. callus. *Annals of Biological Research*, 3(4): 1726-1730.
23. Gibson, D.M., R.E.B. Ketcham, N.C. Vance and A.A. Christen. 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* Nutt. (Pacific yew). *Pant Cell Reports*, 12: 479-482.
24. Gomes, F., M.L. Simoes Lopes and J.M. Canhoto. 2010. Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry). *New Biotechnol*, 27(6): 882-892.
25. Hasandokht, M.R. and R. Ebrahimi. 2006. Basics of plant tissue culture. Marze danesh Press, 328 pp (In Persian).
26. Hosseini-nasr, S.M., O.L. Gamborg and G.C. Philips. 2015. Plant cell, tissue and organ culture. Gamborg, O.L. and Philips, G.C., Ayeezh press, Tehran, 408 pp (In Persian).
27. Hojati, Y., M. Shoor, A. Tehranifar and B. Abedi. 2018. Modification of Flower Color Pigments and Color Composition with Hormonal Treatments and Sucrose in *Tulipa gesneriana* 'Kingsblood'. *Journal of Ornamental Plants*, 9(2): 73-91.
28. Huetteman, A. and E.J. Preese. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell tiss.org.cult*, 33: 105-119.
29. Jaiswal, V.S. and P. Naryan. 1985. Regeneration of plantlets from the callus of stem segment of adult plants of *Fucus religiosus* L. *Plant Cell Reports*, 4: 256-258.
30. Kafi, M., B. Kamkar and A. Mahdavi Damghani. 2001. Seed biology and grain yield, University of Ferdowsi Mashhad press, 232 pp (In Persian).
31. Kamani, M. 2015. Investigation of Micropropagation and Root Induction of *Gleditsia caspica* Desf. Master Thesis, Faculty of Natural Resource, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, 87 pp (In Persian).
32. Khoshkhuy, M. 2011. Plant Growth: Basics and Methods. Caster, D., Davis, F. and Hartman, H.T., Dhiraz University press, 408 pp (In Persian).
33. Kumar, N., G.V. An and M.P. Reddy. 2011. Invitro regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Industrial Crop Product*, 33: 146-151.
34. Li, Y., J. GAO, S.Z. Fei. 2009. High frequency in vitro embryogenic callus induction and plant regeneration from indiangrass mature caryopsis. *Scientia Horticulturae*, 119: 306-309.
35. Mamun, A.N.K., R. Islam, M.A. Reza, OI. Joadar. 1996. In vitro differentiation of plantlet of tissue culture of *Samanea saman*. *Plant Tissue Cult*, 6: 1-5.
36. Marvi mohadjer, M.R. 2006. Silviculture. University of Tehran press, 388 pp (In Persian).
37. Mozafari, A.A. and M. Gerdakaneh. 2012. Influence of media and growth regulators on regeneration and morphological characteristics of strawberry cvs Kurdistan and Merck (*Fragaria*×*ananassa* Duch.). *Int. J. Plant Physiol Biochem*, 4(5): 99-104.
38. Perez-Bermudez, P., M.J. Cornejo and J. Segura. 1983. In vitro propogaion of *Digitalis obscura* L. *Plant Science Letters*, 30: 77-82.
39. Ruan, C.J., X. Zheng, J.A. da Silva, P. Qin. 2009. Callus induction and plant regeneration from embryonic axes of *Kosteletzkya virginica*. *Scientia Horticulturae*, 120: 150-155.
40. Shaheen, U., E.A. Ragab, A.N. Abdalla and A. Bader. 2018. Triterpenoidal saponins from the fruits of *Gleditsia caspica* with proapoptotic properties. *Phytochemistry*, 145(1): 168-178.
41. Sharma, S., N. Kumar and M.P. Reddy. 2011. Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of in vitro regeneration. *Industrial Crops Prod*, 34: 943-951.

42. Skoog, F. and C.O. Miller. 1967. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol, 11: 118-140.
43. Soltani, N.M. 2011. The effect of the combination of somatic vegetative growth regulators on somatic regeneration of micronutrients in *Gleditschia caspica* Desf. Leaf glass. Master Thesis. The University of Kordestan, 92 pp (In Persian).
44. Sujatha, G. and B.R. Kumari. 2007. High-frequency shoots multiplication in *Artemisia vulgaris* L. using thidiazuron. Plant Biotechnology Reports, 1(3): 149-154.
45. Vengadesan, G., A. Ganapathi, S. Amutha and N. Selvarad. 2003. High-frequency plant regeneration from cotyledon callus of *Acacia sinuate* Merr. In vitro Cell Dev Biol Plant, 39: 28-33.
46. Wong, K.W. and C.S. Loh. 1987. In vitro regeneration of plantlets in *Brassica alboglabra*. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 10: 143-148.
47. Xie, D. and Y. Hong. 2001. In vitro regeneration of *Acasia mangiumvie*. Organogenesis plants all Tiss. Org. cult, 66: 167-173.
48. Zarinjoei, F., M.S. Rahmani and N. Shabanian. 2014. In vitro plant regeneration from cotyledon-derived callus cultures of leguminous tree *Gleditschia caspica* Desf. New forests, 45(6): 829-841.

In Vitro Callus Induction and Regeneration of *Gleditsia caspica* Desf

Mojtaba Imani Rastabi¹, Seyed Mohammad Hosseini Nasr², Gholam Ali Ranjbar³ and Mostafa Khoshhal Sarmast⁴

1- Ph.D. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

2- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University,

(Corresponding Author: Smhnasr@sanru.ac.ir)

3- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

4- Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: June 1, 2020 Accepted: December 31, 2020

Extended Abstract

Introduction and Objective: *Gleditschia caspica* Desf is one of the tree species of the Hyrcanian forests. Extreme grazing, overexploitation of livestock, and the lack of natural regeneration system in diverse ecosystems have put *Gleditschia caspica* in danger of extinction. In this study, the conditions of the callus induction and regeneration were investigated under different growth regulators treatments.

Materials and Methods: For this purpose, Stem, hypocotyl and root specimens were cut from sterile intact seedlings and considered as a separate explant. The MS medium supplemented with IBA, NAA and 2, 4-D at different concentrated levels (0.5, 1.5, 3 and 4 mg / l) and TDZ, 2ip, BAP and Kin at different concentrations (0.1, 0.5 and 1 mg/l) were used for callus induction. Growth regulators of TDZ and 2, 4-D on 0.5, 1 and 2 mg/l concentration in MS medium were used to regeneration. Regarding rooting, callus-derived plantlets exposed to 5 μ M IBA in MS media. The characteristics of callus percentage, fresh and dry weight, callus area, color, type and growth curve of calluses were compared. Also, the proliferation percentage and mean number of shoots in each explant were examined.

Results: The results showed that the effect of explants and hormone type on the callus induction percentage showed a significant difference at the level of 99%. The percentage of callus induction in the stem explants was much higher than that of the hypocotyl and roots. The effect of different hormones on all stem explant characteristics was significantly different at 99%. The results showed that the 2, 4-D yielded the highest and IBA resulted to the lowest percentage of callus induction among the studied auxins. Among the cytokines, Kin had the lowest and TDZ leads to the highest percentage of callus induction. The growth curve of fresh and dry weight in regenerated calli indicated the privilege of 2, 4-D compared to other hormones ($p<0.05$).

Conclusion: In general, according to the obtained results, it is recommended to use MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l TDZ formula for indirect regeneration of *Gleditschia caspica*.

Keywords: Auxin, Endemic, Cytokinin, Callus induction, *In vitro*.