دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
بوم‌شناسی جنگل‌های ایران

"مقاله پژوهشی"

القای پینه و باززایی لیلکی ایرانی (*Gleditschia caspica* Desf.) در شرایط درون شیشه‌ای

مجتبی ایمانی راستابی[۱]، سیّدمحمّد حسینی‌نصر[۲]، غلامعلی رنجبر[۳] و مصطفی خوشحال‌سرمست[۴]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: 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: ۴۳ تا ۵۳

چکیده مبسوط

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

مواد و روش‌ها: برای این منظور، ریزنمونه‌های ساقه، هیپوکوتیل و ریشه از دانهال‌های استریل حاصل از بذر تهیه گردید. برای القای پینه از محیط کشت MS حاوی اکسین‌های IBA، NAA و 2,4-D در سطوح غلظتی (۰/۵، ۱/۵، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) و سیتوکنین‌های TDZ، 2ip، BAP و Kin در غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. برای باززایی از تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و 2,4-D در غلظت‌های ترکیبی ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS استفاده شد. برای ریشه‌زایی از محیط کشت نیم غلظت MS حاوی IBA با غلظت 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 تنظیم‌کننده‌های 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 تنظیم‌کننده‌های 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 سیتوکنین‌های 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 تنظیم‌کننده‌های رشد داشت. نتایج باززایی نشان داد که میانگین شاخساره‌های نابجا تشکیل شده روی پینه و تعداد شاخه در هر تک پینه به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد است ($P< 0.5$).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی مطابق نتایج به‌دست 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، سیتوکنین، کشت بافت، لیلکی ایرانی

مقدمه

بوم‌سازگان هیرکانی یا جنگل‌های شمال ایران یکی از منحصربه‌فردترین 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 (۳۶). لیلکی گونه‌ای نادر محسوب می‌شود که به‌دلیل 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 به‌طور مثال در پژوهشی روی لیلکی ایرانی انجام شده هیچ اشاره‌ای به اندمیک بودن این گونه نکرده‌اند (۴۰).

درختان جنگلی از تیره بقولات، به دلایلی مختلفی مانند قطع بی‌رویه برای توسعه زمین‌های زراعی و چرای دام (۱۴)، طولانی‌بودن خواب بذر و تکثیر کند و کمتر از طریق جنسی (بذر) (۴۵) دچار کاهش شدید جمعیتی هستند. بر این اساس 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، توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی بی‌شکل و تمایز نیافته با دیواره سلولی نازک است که هم در شرایط طبیعی و هم آزمایشگاهی به‌صورت سازمان نیافته رشد می‌کند (۱۷). پینه‌ها از طریق اندام‌زایی و یا جنین‌زایی رویشی قابلیت باززایی و تبدیل‌شدن 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 تنظیم‌کننده 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[۲] لیلکی ایرانی نتایج مطلوبی به‌همراه دارد (۳۱). پژوهشی با هدف بهینه‌سازی جنین‌زایی سوماتیکی از ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای برگ لیلکی ایرانی با استفاده از برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انجام شد و نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی از یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵

1- Micro propagation
2- Propagation

میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط نیم غلظت MS، بهینه‌ترین ترکیب برای القای پینه از ریزنمونه برگ لیلکی ایرانی است (۴۳). در پژوهشی به‌منظور ریزافزایی درون‌شیشه‌ای از کشت پینه‌های کوتیلیدون گونه لیلکی نتیجه گرفتند که پینه‌های کشت شده روی محیط کشت MS حاوی BAP بالاترین درصد (۹۴ درصد) پینه‌زایی را نشان دادند (۴۸). در پژوهشی، با کاربرد TDZ در غلظت‌های ۰/۲۲ الی ۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با دو غلظت ۰/۲۵ و دو میلی‌گرم در لیتر IAA موفق به پینه‌زایی گونه *Acacia magnium* در محیط کشت MS گردیدند (۴۷). در بررسی‌های صورت گرفته روی ساقه، ریشه و پوست درختان جنگلی سرخدار .*Taxus baccata* L (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 2,4-D دارای عملکرد بهتری نسبت به دیگر تنظیم‌کننده‌های مورد مطالعه داشته است. نتایج پژوهشی بر القای پینه گونه کهور پارکیا (*Parkia biglobosa* Jacq. Benth) نشان داد که 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 2,4-D منجر به بالاترین 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 باززایی لیلکی ایرانی در برابر تنظیم‌کننده‌های متفاوت رشد در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد. هدف نهایی تحقیق، بازایی گیاه و جلوگیری از انقراض این گونه ارزشمند اندمیک 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 ضدعفونی کردن، بذرها در زیر هود کشت بافت به‌مدت ۱۰ دقیقه در کلرید جیوه ($HgCl_2$) نیم درصد (۳۲) قرار داده شدند و پس از آبکشی با آب مقطر استریل، به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد تیمار شدند. بذرهای ضدعفونی‌شده در محیط کشت DKW (۱۵) دارای سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با منبع لامپ فلورنس سفید و شدت ۲۵۰۰ لوکس نوری نگهداری شدند.

القای پینه ریزنمونه ریشه، هیپوکوتیل و ساقه

پس از گذشت ۲۰ روز، از ریشه، ساقه و هیپوکوتیل گیاهچه‌های به‌وجود 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 2,4-D در غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر بودند. همچنین از سیتوکنین‌های BAP، 2-ip، TDZ و کاینتین KIN در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۷۲ ساعت در تاریکی مطلق، در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد درجه سانتی‌گراد 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 اندام‌زایی 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، ۱۴، 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 سبز و زرد حاصل از ریزنمونه‌های ساقه به دو الی چهار قسمت تقسیم شدند و به محیط کشت‌های تیمار (جدول ۱) منتقل شدند.

جدول ۱- ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و مقادیر آنها در فاز شاخه‌زایی
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 mgl^{-1} 2,4-D + 0/5 mgl^{-1} TDZ	M6	MS+ 1 mgl^{-1} 2,4-D + 2 mgl^{-1} TDZ
M_2	MS+ 0.5 mgl^{-1} 2,4-D + 1 mgl^{-1} TDZ	M7	MS+ 2 mgl^{-1} 2,4-D + 0/5 mgl^{-1} TDZ
M_3	MS+ 0.5 mgl^{-1} 2,4-D + 2 mgl^{-1} TDZ	M8	MS+ 2 mgl^{-1} 2,4-D + 1 mgl^{-1} TDZ
M_4	MS+ 1 mgl^{-1} 2,4-D + 0/5 mgl^{-1} TDZ	M9	MS+ 2 mgl^{-1} 2,4-D + 2 mgl^{-1} TDZ
M_5	MS+ 1 mgl^{-1} 2,4-D + 1 mgl^{-1} TDZ		

ریشه‌زایی و سازگاری گیاه

برای ریشه‌زایی اندام‌های باززایی شده روی پینه از محیط کشت MS + 5 µM IBA (۳۱) استفاده گردید. کشت‌ها در دمای ۲۵± درجه سانتی‌گراد 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

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 انجام پذیرفت.

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

نتایج و بحث

درصد پینه‌زایی درریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل

بعد از گذشت ۲۰ روز، پینه‌زایی در ریزنمونه‌ها مشاهد گردید. با توجه به اینکه ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های استریل تهیه شده بود، هیچ‌گونه آثاری از آلودگی مشاهده نگردید. اما بعد از گذشت ۴۰ روز و پس از زیرکشت اول اندکی قهوه‌ای 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).

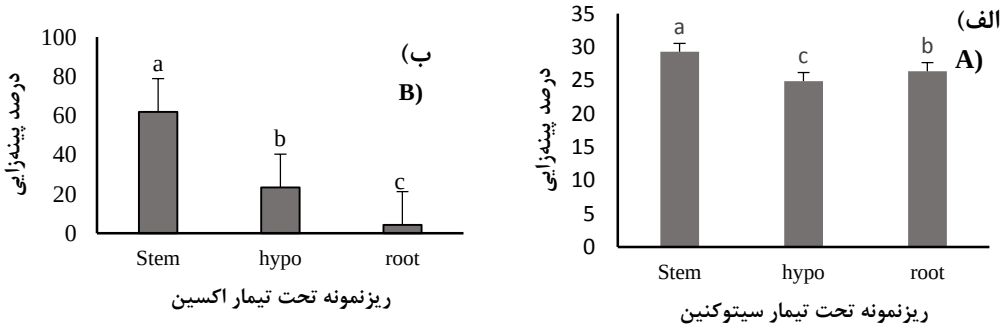
جدول ۲- تجزیه واریانس القای پینه ریزنمونه‌های ساقه، هیپوکوتیل و ریشه تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد
Table 2. ANOVA callus induction of stem, hypocotyl and root explants under the influence of growth regulators

منبع تغییرات	اکسین			سیتوکنین		
	درجه آزادی	مجموع مربعات	آماره F و معنی‌داری	درجه آزادی	مجموع مربعات	آماره F و معنی‌داری
تنظیم‌کننده‌های رشد	۲	۹۷۸۳/۸۰	۲۰۳/۲۰**	۳	۴۱۳۵۶/۲۵	۴۵۴/۶۰**
غلظت	۳	۶۶۱/۱۱	۹/۱۵**	۲	۳۹۴۶/۲۹	۴۶/۳۸**
ریزنمونه	۲	۶۱۷۸۱/۰۲	۱۲۸۳/۱۴**	۲	۲۸۱۲/۹۶	۶۵/۰۷**
تنظیم‌کننده‌های رشد × غلظت	۶	۴۴۵۶/۹۴	۳۰/۸۶ **	۶	۱۶۱۱/۱۱	۸/۸۵ **
تنظیم‌کننده‌های رشد × ریزنمونه	۴	۷۵۵/۷۹	۳۱/۳۹**	۶	۲۷۰۰/۰۰	۱۴/۸۴**
تنظیم‌کننده‌های رشد × ریزنمونه × غلظت	۱۲	۲۴۷/۴۵	۱۰/۲۸**	۱۲	۲۳۵۹/۷۲	۶/۴۸**

**: معنی‌داری در سطح یک درصد (P< 0.1)

اثر نوع ریز نمونه 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 به‌ترتیب 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 سیتوکنین‌های مختلف نشان داد.

در پژوهش‌های مختلف به عملکرد درصد پینه‌زایی بیشتر ساقه نسبت به اندام دیگر گیاه اشاره شده است (۴۶،۳۱،۱،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.



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد پینه‌زایی برای اساس تنظیم‌کننده‌های رشد، سیتوکنین (الف) و اکسین (ب).
Figure 1. Mean comparison of based on growth regulators, cytokinin (A) and auxin (B)

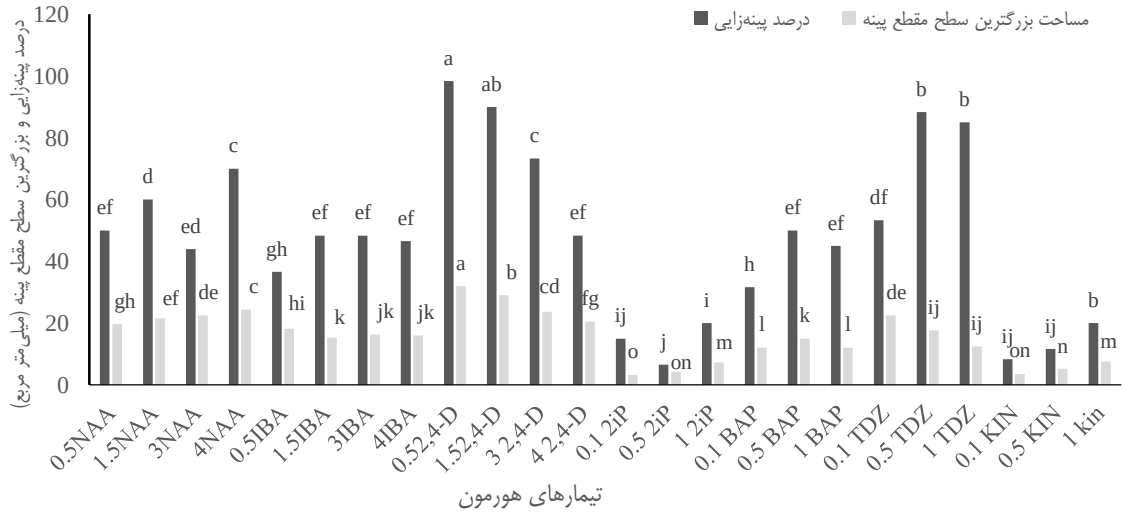
القای پینه در ریزنمونه ساقه لیلکی ایرانی

با توجه به نتایج به‌دست 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 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.

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. به‌طور کلی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، 2iP و Kin پینه‌های همگن و یا نسبتاً همگن تولید کردند و تنظیم‌کننده‌های رشد دیگر پینه‌هایی با بافت ناهمگن ایجاد کردند. همچنین در تنظیم‌کننده‌های رشد IBA، 2iP، BAP و 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 Kin، قهوه‌ای رنگ و تیره مشاهده گردید. پینه‌ها معمولا به رنگ سفید یا سبز هستند (۱۷،۲۵). نتایج رنگ پینه‌ها نشان از تنوع رنگی پینه تولید شده در تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بود. این تنوع رنگ را می‌توان به دلیل حضور رنگیزه‌های آنتوسیانین (۱۸) که حاصل سنتز و تعامل پیچیده 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 غیریکنواختی پینه‌ها با یک‌دیگر 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 متاثر از NAA در غلظت ۰/۵ میکرومول، IBA در غلظت سه و چهار میکرومول و 2,4-D به استثنا غلظت چهار 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 معنی‌دار 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 2,4-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. به‌طور کلی در بین اکسین‌های مورد مطالعه، 2,4-D در غلظت‌های مختلف بیشترین و IBA کمترین درصد پینه‌زایی را نشان داد. در بین سیتوکنین‌های مورد مطالعه، Kin کمترین و TDZ بیشترین درصد پینه‌زایی را از خود نشان داد. در ابتدا انتظار می‌رفت که BAP به مانند بسیاری از پژوهش‌ها (۴،۱۱،۲۱) از دیگر سیتوکنین‌ها درصد پینه‌زایی بیشتری را نشان دهد. اما نتایج پژوهش نشان از برتری TDZ نسبت به دیگر سیتوکنین‌های 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).

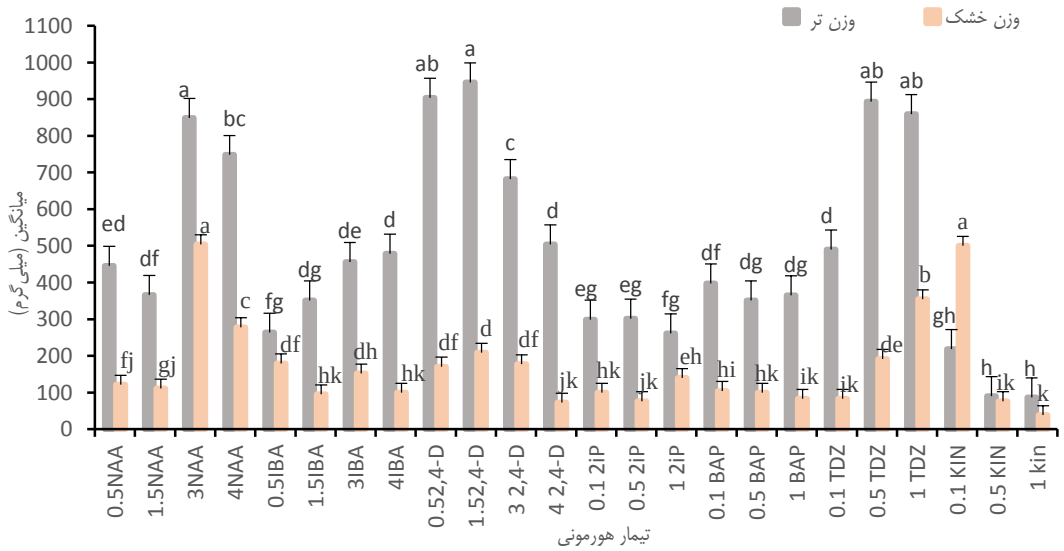
مقایسه میانگین مساحت بزرگترین سطح مقطع پینه نشان داد که 2,4-D در غلظت ۰/۵ میکرومول در لیتر، به میزان ۳/۱۹ سانتی‌متر مربع، بیشترین سطح مقطع پینه را در بین اکسین‌های مورد مطالعه ایجاد کرد. TDZ در غلظت ۰/۱ میکرومول بر لیتر، بیشترین میانگین را بین سیتوکنین‌های مورد مطالعه نشان داد (شکل ۲).



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 به‌صورت 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

2,4-D به‌طور گسترده برای تولید و حفظ پینه استفاده می‌شود (۸) و در تحقیقات زیادی مشاهده شد که 2,4-D بهترین و معمول‌ترین اکسین به‌منظور تولید پینه در تک لپه‌ای‌ها و حتی در دولپه‌ای‌ها می‌باشد (۳۵،۱۰،۲۷). TDZ شبه سایتوکنین موثر در کشت بافت گونه‌های چوبی می‌باشد (۳۳). به‌نظر می‌رسد رابطه معکوس بین درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌های ساقه لیلکی ایرانی و غلظت 2,4-D وجود دارد. تاثیر 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). به‌طور کلی 2,4-D و TDZ در سطوح غلظتی مختلف دارای راندمان بالاتر از ۶۰ درصد پینه‌زایی بودند.

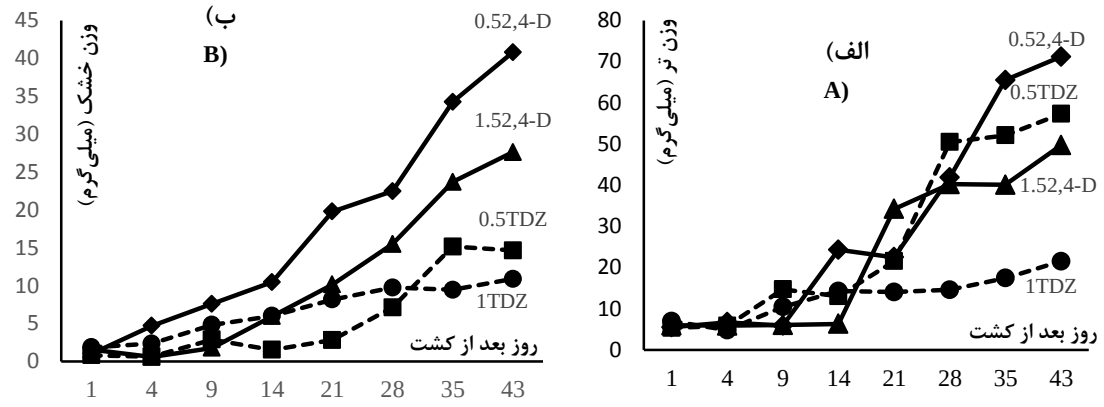


شکل ۳– آزمون مقایسه میانگین وزن تر و خشک بر اساس اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و سطح غلظت بر ریزنمونه‌های ساقه. حروف روی ستون مربوط به هر مشخصه، به‌صورت مجزا از مشخصه دیگر در نظر گرفته شده است

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

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 ۱/۵ و ۰/۵ میکرومول در لیتر، به‌ترتیب به میزان ۹۴۶ و ۹۰۴ میلی‌گرم بیشترین وزن تر را در میان دیگر اکسین‌های به کار رفته داشتند. از بین سیتوکنین‌های 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 ۳۰۴/۴ میلی‌گرم بیشترین وزن خشک را در میان دیگر اکسین‌ها داشت. از بین سیتوکنین‌های مورد مطالعه نیز، TDZ در غلظت یک میکرومول بر لیتر با میانگین ۲۵۴/۳ میلی‌گرم بیشترین وزن خشک را نشان داد.

وزن تر و خشک پینه به‌طور گسترده به‌عنوان معیاری از رشد پینه‌ها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. در پژوهشی بیان شده است که سطوح زیاد TDZ باعث تحریک پینه‌زایی می‌شود (۲۸). نوع سیتوکینین به کار گرفته در محیط کشت در میزان باززایی و قدرت رشد گیاهان باززایی شده تأثیرگذار است و از اساسی‌ترین عوامل مؤثر بر موفقیت در کشت بافت باشد. در ارتباط با سیتوکنین‌های 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 وزن‌تر و خشک بالاتری برخوردار بوده‌اند. این نتایج با یافته‌های (۲۴) 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).



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

سیتوکینین‌ها موجب تقسیم سلولی شده و رشد و تشکیل پینه را سبب می‌شوند (۱۲). TDZ شبه سیتوکینین مؤثر در کشت بافت گونه‌های چوبی می‌باشد (۱۳) و تأثیر آن بر القای اندام‌زایی، ساقه‌زایی، پینه‌دهی و تولید شاخساره 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 باززایی پینه می‌تواند مربوط به تعدیل نمودن غلظت بالای اکسین درون ساقه لیلکی ایرانی باشد. هر چند که این موضوع بایستی با اندازه‌گیری میزان اکسین درون ساقه این گیاه نسبت به ریز نمونه‌های 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 وزن‌تر و خشک پینه در تیمار 2,4-D در غلظت نیم میلی‌گرم بر لیتر بعد از گذشت ۴۳ روز بیشتر از دیگر تیمارها بود. همچنین تیمار نیم میلی‌گرم TDZ 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 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 تأئید می‌کند به‌طوری که منحنی‌های مذکور نشان می‌دهند که رشد پینه ریزنمونه‌های ساقه، تحت تأثیر 2, 4-D بیش از سایر اکسین‌ها می‌باشد. آنجا که وزن‌تر و خشک گیاه به‌عنوان تابعی از زمان، به‌عنوان اساسی‌ترین اطلاعات برای آنالیزهای رشد مطرح است (۳۰) پیش‌بینی می‌شد که با گذشت زمان، ریزنمونه‌ها تحت تأثیر اکسین 2,4-D رشد بیشتری داشته باشد. زیرا 2, 4-D محرک قوی برای ایجاد و رشد پینه محسوب می‌شود (۳۵،۲۹،۱۰).

اندام‌زایی، ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه لیلکی ایرانی

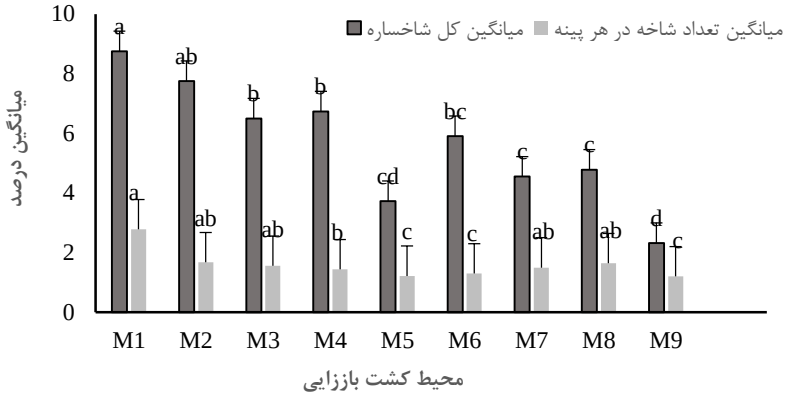
بعد از گذشت دو هفته از انتقال پینه‌های ساقه به محیط کشت باززایی، پینه‌ها به رنگ سبز متمایل شدند. نتایج تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر باززایی پینه بعد از گذشت شش ماه در جدول ۶ آمده است. نتایج نشان داد که میانگین شاخساره های نابجا تشکیل شده روی پینه و تعداد شاخه در هر تک پینه به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفت ($P< 0.5$).

جدول ۴- تجزیه واریانس تنوع تنظیم‌کننده‌های رشد بر شاخه‌زایی
Table 4. ANOVA of various of growth regulators on shoot induction

منبع تغییرات	درصد شاخه‌زایی			درصد تعداد شاخه پینه	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری	میانگین مربعات	آماره F و معنی‌داری
تنظیم‌کننده رشد	۸	۸/۳۲۳	۴/۲۹**	۰/۸۲۱	۵/۷۸*
خطا	۲۷	۱/۹۴۵		۰/۱۴۲	

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

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 2,4-D و TDZ از میزان پرآوری 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 بی‌شکل و غیر عادی بودند که با گذشت زمان رشد نداشتند. بنابراین به‌طور کلی استفاده از محیط M_1 برای باززایی پینه پیشنهاد می‌شود.



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

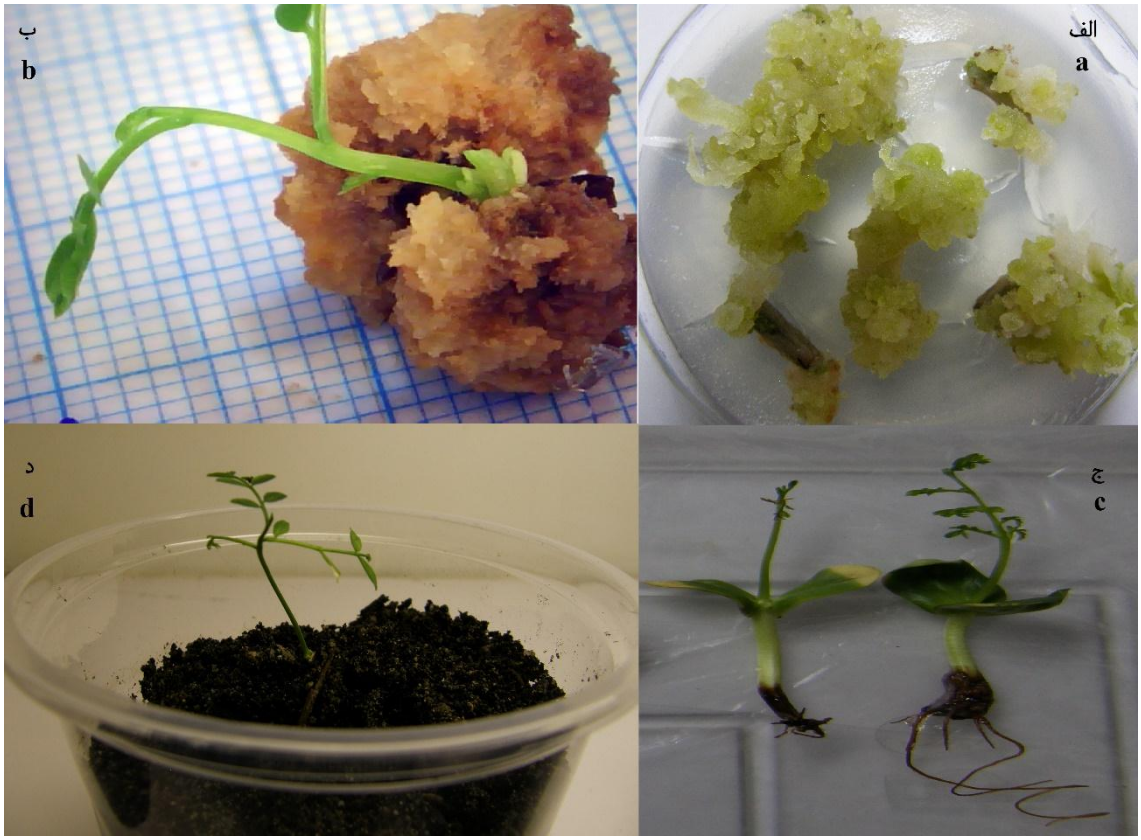
Figure 5. Mean comparison shoot induction under the influence of growth regulators. The words on each column related to each characteristic are considered separately from other characteristics

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 تاثر گذار است (۳۶). در این تحقیق استفاده توأم از TDZ و 2,4-D 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، باززایی مشاهده گردید. (۳) نتیجه گرفتند که استفاده از TDZ و 2,4-D تاثیر بسیار زیادی در تولید پینه و شکل‌زایی (مورفوژنز) آن دارد. با توجه به مقایسه میانگین باززایی پینه (شکل ۵)، با افزایش غلظت 2, 4-D به‌طور نسبی از میانگین باززایی و تعداد شاخه کاسته شده است. با توجه به تأثیر بیشتر اکسین‌ها در تولید اندام هوایی گیاهان (۳۴،۲۴،۳) پیش‌بینی می‌گردید که باززایی پینه لیلکی ایرانی بیشتر متأثر از تغییر 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 شده‌ی نسبی نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۳۰ روز از انتقال گیاهچه‌ها بعضی از آنها دارای رشد 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 باززایی 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 باززایی 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 انقرض این گونه ارزشمند جلوگیری نماید.



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

1. 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.
2. 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).
3. 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.
4. 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.
5. Asadi, M. 1998. Autecology, seed germination ecophysiology and chemical analaysis of different parts of fruit in *Gleditsia caspica* Desf. Master Thesis, Faculty of science, University of shahid Beheshti, 133 pp (In Persian).
6. Bagheri, A., A. Sharifi and N. Moshtaghi. 2010. Applied plant tissue culture. 1sd edn, Mashhad University Jihad Press, Mashhad, Iran, 480 pp (In Persian).
7. Burkhin, 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.
8. 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.
9. Chalupa, V. 1987a. Effect of bezylaminopurine and thidiazuron on *invitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus ancuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. Biol. Plant, 29: 425-429.
10. Chee, PP. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. Hort. Sci, 25: 792-793.
11. 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. Ghareyazie 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 gluthanine 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. Hojjati, 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 religosia* 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 caryposis. 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 *Samonea 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. Boil, 11: 118-140.
43. Soltani, N.M. 2011. The effect of the combination of somatic vegetative growth regulators on somatic regeneration of micronutrients in Gleditsia 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 Gleditsia caspica Desf. New forests, 45(6): 829-841.

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

Mojtaba Imani Rastabi[1], Seyed Mohammad Hosseini Nasr[2], Gholam Ali Ranjbar[3] and Mostafa Khoshhal Sarmast[4]

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 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 *Gleditsia 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 µM 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*.