

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

لیلا سمیعی^{۱*}، هما میرشاهی^۲، محبوبه داوودی پهنه کلایی^۳ و علی تهرانی فر^۴
 ۱ و ۲. استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 ۳ و ۴. 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 لیسیموم 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 لیسیموم 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 لیسیموم مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج این آزمایش، محیط کشت موراشیگ و اسکوک (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 از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به طور موفق در اتاقک رشد سازگار شدند. در مجموع نتایج این تحقیق منجر به دست‌یابی به روش بهینه ریزازدیادی درختچه بومی لیسیموم 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 Mirshahi², Mahboubeh Davudi Pahneshkolayi³ and Ali Tehranifar⁴

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. depressum* was investigated. In the first experiment, the effects of benzylaminopurin (BAP) and thidiazuron (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 نیمه خشک پرورش می یابد (Mohseni et al., 2017). پراکنش جهانی این گیاه در ایران، ترکمنستان، افغانستان، پاکستان و عراق می باشد (Mozaffarian, 2005). جنس لیسیوم دارای ۸۰ تا ۹۰ گونه در سراسر دنیا می باشد که ۶ گونه از آن به همراه دو زیر گونه از ایران گزارش شده است (Khatamsaz, 1998). گیاه لیسیوم در طبیعت به فرم درختچه ای می باشد و تا ارتفاع ۲/۵ متر رشد می نماید. برگ های این گیاه به شکل مستطیلی و اغلب با نوک کند می باشد. جام گل به صورت قیفی و به رنگ ارغوانی و طول ۸ تا ۱۲ میلی متر می باشد. این گیاه در ایران از استان های خراسان، گیلان، یزد، فارس و آذربایجان گزارش شده است (Mozaffarian, 2005). در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که برگ های گیاه لیسیوم حاوی مواد آنتی اکسیدانی، فلاونوئیدی و فنلی بالا می باشد 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 گونه های دیگر جنس لیسیوم می باشد که دارای خواص دارویی بسیار بالا و شناخته شده ای در دنیا می باشد 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 ویژگی های ظاهری مناسب و قابلیت مقاومت به شرایط خشکی و شوری و همچنین قابلیت هرس پذیری بالا می تواند کاندید بسیار مناسبی جهت استفاده در فضای سبز شهری باشد. استفاده از گیاهان بومی در فضای سبز به لحاظ این که سال ها به شرایط اقلیمی زیستگاه خود سازگار شده اند و نیاز به مراقبت های کمتری در فرایندهای کاشت و نگهداری دارند، اهمیت به سزایی در کاهش هزینه های احداث و نگهداری فضای سبز

دارد. علاوه بر این با توجه به این که ایران در اقلیم خشک و نیمه خشک قرار گرفته است و با کمبود منابع آبی روبه رو می باشد، 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 پتانسیل های بالای گیاه لیسیوم، تا کنون مطالعه ای در خصوص امکان تکثیر این گیاه ارزشمند صورت نگرفته است. امروزه روش های نوین ازدیاد گیاهان مانند روش ریز ازدیادی جایگزین روش های تکثیر کلاسیک شده است و بسیاری از گونه های زینتی و دارویی و زراعی از این طریق تکثیر می شوند (Esmaeili, et al., 2016; Samiei et al., 2018). از مزایای این روش سرعت و راندمان بالای تکثیر و همچنین دست یابی به گیاهان یکنواخت، سالم و عاری از عوامل بیماریزا می باشد (Carrillo-Bermejo et al., 2018). از تکنیک کشت بافت تا کنون جهت ریز ازدیادی موفق گونه های دیگر لیسیوم مانند *Lycium barbarum* (Fira et al., 2016) و *Lycium chinensis* (Maseda et al., 2004) استفاده شده است. در این آزمایش ها اندام های مختلف گیاه اعم از جوانه، برگ و ریشه به عنوان ریزنمونه اولیه استفاده شده است.

گاهی اوقات در طی مراحل تولید گیاهان از طریق ریز ازدیادی گیاهچه های بازرایی شده در شرایط کشت بافت ضعیف بوده و از کیفیت بالایی برخوردار نمی باشد. یکی از روش هایی که می تواند منجر به افزایش رشد و کیفیت این گیاهچه ها شود، استفاده از برخی مواد مکمل رشد در مراحل مختلف ریز ازدیادی می باشد که در کنار استفاده از تنظیم کننده های رشد گیاهی باعث افزایش کیفیت گیاهچه ها و یا افزایش راندمان تکثیر می شوند. این مواد می توانند شامل ترکیبات آلی مختلف مانند کازئین هیدرولیزات، ال-پرولین و برخی ترکیبات شبه قندی مانند میواینوزیتول و همچنین اسیدهای آمینه مختلف باشد. گزارش های مختلفی مبنی بر افزایش رشد و راندمان ریز ازدیادی گیاهان با استفاده از این مواد ارائه شده است (Bai &

شاخه‌ها به قطعات به طول ۳ تا ۵ سانتی‌متر هر کدام حاوی ۲ تا ۳ جوانه برش زده شدند و به مدت یک ساعت در زیر آب جاری قرار گرفتند. بقیه مراحل ضدعفونی شامل شستشو با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و در نهایت آبخوبی 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 به مدت 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 تیدپازورون TDZ با غلظت‌های (۰، ۰/۰۲، ۰/۰۲، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به صورت جداگانه و همچنین هر

(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 پاره‌ای از موارد علائم کلروز برگ 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 ریزازدیادی استفاده شد. تأیید هویت دقیق این زیرگونه با نام علمی *Lycium depressum* Stock subsp. توسط هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت. لازم به ذکر که رویشگاه اصلی این گیاه شهرستان نیشابور واقع در شمال غربی 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

حاوی غلظت‌های مختلف هورمون IBA (۰، ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹ و 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 ریشه‌دار شده 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 (۱:۱ حجمی: حجمی) که قبلاً 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 لیسیموم

براساس نتایج تجربه 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

کدام در ترکیب با غلظت‌های صفر و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) انتقال یافتند (شکل ۱-a و شکل ۱-b). داده‌های آزمایش پس از دو دوره واکنش 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 لیسیموم در شرایط درون‌شیشه‌ای

این آزمایش پس از اتمام آزمایش قبل و دست‌یابی به تنظیم‌کننده‌های رشد مناسب جهت پرآوری شاخساره گیاه لیسیموم 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 واکنش 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 پرآوری شده 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 پرآوری شده

لیسیموم در شرایط درون‌شیشه‌ای

در این آزمایش شاخساره‌های پرآوری شده از آزمایش قبل از یکدیگر جدا شدند و شاخساره‌هایی به طول ۳ سانتی‌متر انتخاب گردیدند و در محیط کشت MS

بر پرآوری شاخساره گیاه لیسیموم 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). 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 سیتوکینین‌ها 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 لیسیموم 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 موارد به‌دلیل بالابودن اکسین داخلی در برخی از گیاهان، افزودن اکسین به محیط کشت می‌تواند اثر منفی

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 ۰/۲ 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 لیسیموم 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 لیسیموم 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

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 لیسیموم 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 از نتایج آزمایش اول (استفاده از تیمار هورمونی بهینه) به همراه تیمارهای مختلف مواد آلی و معدنی جهت بهبود پرآوری و کیفیت ریزنمونه‌ها صورت پذیرفت.

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. به نظر 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). TDZ همچنین 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



شکل ۱. مراحل مختلف ازدیاد درون‌شیشه‌ای گیاه *Lycium depressum*: (a) مرحله استقرار ریزنمونه‌ها، (b) مرحله پرآوری در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر 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 بر لیتر IBA، (e) گیاهچه‌های سازگار شده پس از گذشت یک ماه از انتقال به شرایط برون‌شیشه‌ای 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 variance 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 میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

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

کازئین مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. کمترین تعداد شاخساره (۲/۱) نیز در تیمار حاوی پرولین مشاهده شد. لازم به ذکر است در تیمارهای حاوی آهن، کلرید کلسیم و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول نیز میزان تولید شاخساره اندک بود (شکل ۲).

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 (شکل ۲).

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

ارزیابی اثر ترکیبات آلی و معدنی مختلف در بهبود پرآوری شاخساره در گیاه لیسیموم 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 میانگین‌ها 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 (شکل ۲).

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

فرایندهای بیولوژیک گیاه مانند فتوسنتز، سنتز کلروفیل، تنفس، تثبیت نیتروژن و مکانیسم‌های جذب و سنتز DNA دارد. گزارش شده است که FeEDTA به دلیل 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 باززایی شده را افزایش دهد. احتمال می‌رود که غلظت استفاده شده این عنصر در محیط کشت مناسب نبوده است و نیاز به بهینه سازی میزان این عنصر جهت باززایی بهینه گیاه لیسیم 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 *Juglans nigra* (Bosela, Michler & Biology-Plant, 2008) و *Ulmus minor* (Shukla et al., 2012) و *Juniperus phoeniceus* (Loureiro et al., 2007) اشاره کرده اند.

ارزیابی قابلیت ریشه‌زایی گیاهچه‌های پرآوری شده لیسیم در شرایط درون‌شیشه‌ای

ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌ویژه ریشه‌زایی گیاهان چوبی یکی از مهمترین مراحل ریزازدیادی می‌باشد. در این آزمایش IBA با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را در ریشه‌زایی لیسیم داشت، به طوری که 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 ۱-ع تا ۱-ه).

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., 2015; Sarropoulou et al., 2018). 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 لیسیم را تأیید می‌نماید.

گیاهان پرورش یافته در محیط کشت حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات، میزان پرآوری نسبتاً 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., 2014; Pandey & Tamta, 2001). 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 لیسیم 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 لیسیم نبود.

نتایج آزمایش نشان داد که گیاهان پرورش یافته در محیط کشت حاوی آهن FeEDDHA طول شاخه نسبتاً 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

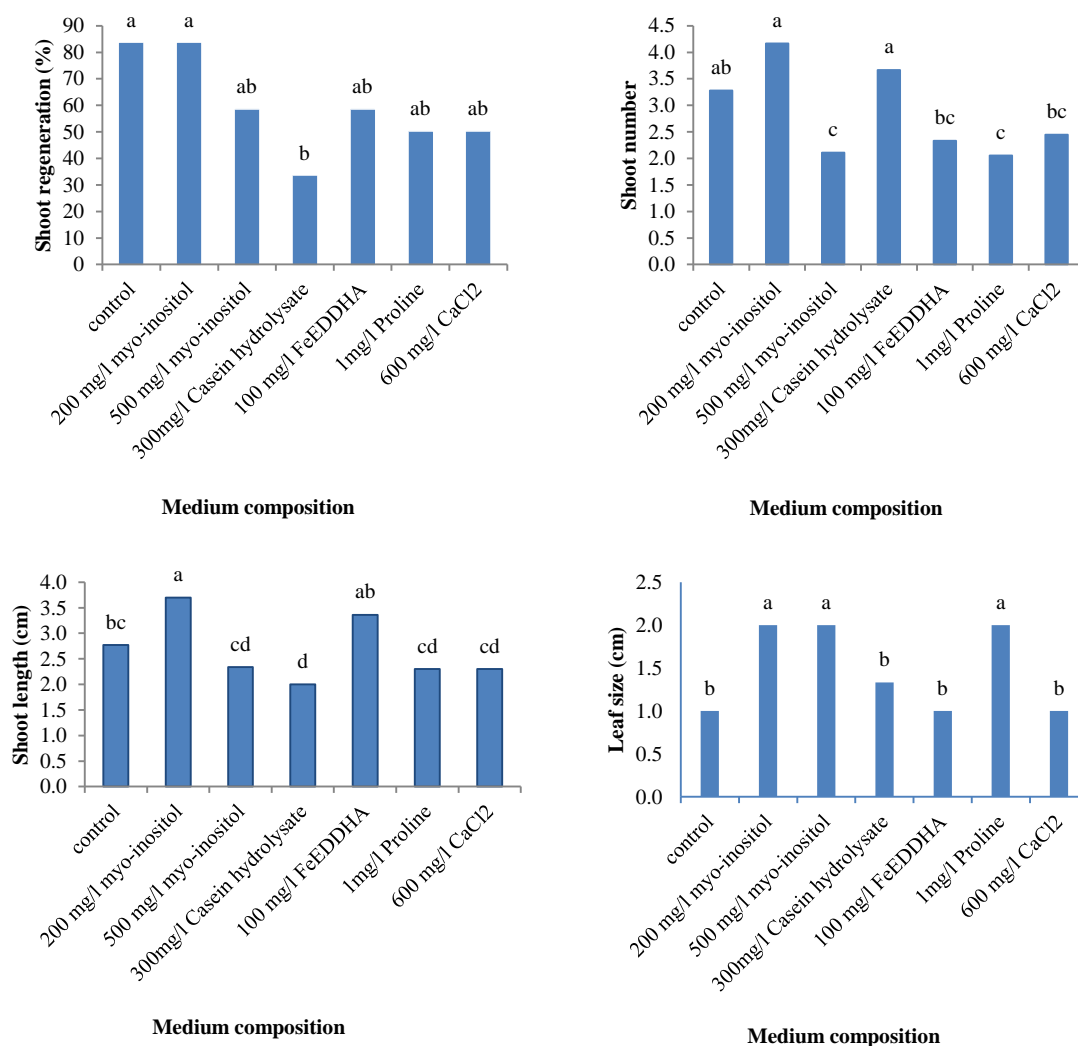
جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر ترکیبات آلی و معدنی مختلف بر شاخص‌های پرآوری گیاه *Lycium depressum* در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 4. Results of variance 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*

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.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق منجر به ارائه پروتکل بهینه جهت ریزازدبای گیاه لیسوم گردید. بهترین محیط پرآوری شاخساره برای گیاه لیسوم محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. آزمایش‌های بعدی نیز

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 گزنت شماره ۳۸۴۵۰ به انجام رسیده است، که بدینوسیله از مساعدت دانشگاه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

لازم به ذکر است که مطالعه ریزازدیادی گیاه لیسیموم 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 این که این گیاه علاوه بر قابلیت بالا جهت استفاده در فضای سبز، خواص دارویی بسیار ارزشمندی نیز دارد، دستیابی به روش بهینه ریزازدیادی این گیاه، زمینه را جهت

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., Stirr, 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 Gooji 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 Abadan 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., Moisaner, 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., Panhekolavi, 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.