

بررسی عامل‌های مؤثر در پینه‌زایی، جنین‌زایی رویشی و باززایی پالونیا شان‌تونگ (*Paulownia shantong*)

یاسین دومانی^۱، سید محمدمهدی مرتضویان*^۲، علی ایزدی‌دربندی^۳، حسین رامشینی^۴ و مسلم بهمن‌کار^۵

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (yassin.dumani@ut.ac.ir)
- ۲- دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (mortazavian@ut.ac.ir)
- ۳- دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (aizady@ut.ac.ir)
- ۴- دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (ramshini_h@ut.ac.ir)
- ۵- دکتری، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (bahmankar_64@alumni.ut.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۰

چکیده

این پژوهش برای بررسی پینه‌زایی، جنین‌زایی رویشی و باززایی غیرمستقیم پالونیا شان‌تونگ (*Paulownia shantong*) انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد. عامل‌های مورد بررسی شامل نوع ریزنمونه و ترکیبات مختلف محیط کشت MS بود. اثر متقابل دوگانه ریزنمونه و محیط کشت برای بیشتر صفات اندازه‌گیری شده مانند زمان القای پینه، درصد القای پینه، مساحت پینه و درصد پینه‌های جنین‌زا معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشینه باززایی جنین‌های رویشی در ریزنمونه دم‌برگ و محیط کشت $1/2 \text{ MS} + 0.3 \text{ mg/l 2.4-D} + 2 \text{ mg/l KIN} + 4 \text{ mg/l BAP} + 0.30 \text{ mg/l GA3}$ به‌دست آمد. آزمایش بررسی القای ریشه‌زایی در گیاهچه‌های باززایی شده به‌صورت فاکتوریل بر مبنای طرح بلوک‌های کامل تصادفی با پنج تکرار انجام شد. عامل‌های آزمایش شامل غلظت نمک‌ها در محیط کشت پایه (MS کامل و $1/2 \text{ MS}$) و نوع تنظیم‌کننده رشد (IAA و NAA, JBA) بود که بیشترین درصد ریشه‌زایی در ترکیب تیماری $1/2 \text{ MS} + 1.5 \text{ mg/l IBA}$ مشاهده شد. نتایج نشان داد که باززایی جنین‌های رویشی در محیط کشت پایه MS کامل نسبت به دیگر محیط‌های مورد بررسی ضعیف‌تر بوده است.

واژه‌های کلیدی: القای پینه، محیط کشت، ریزنمونه، ریشه‌زایی.

مقدمه

(Jazirei, 2003). نیاز روزافزون به چوب و کاهش منابع چوبی سبب ایجاد و تشدید جنگل کاری با گونه های تندرشد شده است (Swamy et al., 2006).

این گیاه به منظور کنترل آلودگی هوا و خاک، بازسازی اراضی و به عنوان یک درخت تندرشد زیتتی که سایه و گل های بسیار جذابی دارد مورد استفاده و توصیه قرار گرفته است (Melhuish et al., 1990, Bergman, 1998, Wang and Shogren, 1992). ارزش پالونیا برای تولید کود از برگ و تولید عسل با خواص دارویی از گل های آن به اثبات رسیده است برگ های پالونیا با داشتن ۸۹ درصد وزن خشک نیتروژن، تقویت کننده خاک (خاک برگ و کود سبز) بوده و برای تغذیه دام (پرورش اسب و بز و پرواربندی گوساله و بره) بسیار مناسب هستند (Zhu et al., 1986). گونه های *Paulownia* غنی از متابولیت های ثانویه مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا و دیگر فعالیت های دارویی هستند که در بافت های درخت توزیع شده اند (Si et al., 2002, Chang et al., 2011, Bahri and Bettaieb, 2013).

چای و شربت شکوفه های پالونیا مشکلات کبد و طحال را برطرف کرده و همچنین در بهبود برونشیت تاثیرگذار است. علاوه بر این پوست درخت پالونیا در طب سنتی چین برای بیماری های عفونی پوست مورد استفاده قرار می گیرد (Castillo-Zhu et al., 1986, Martínez et al., 2012, Si et al., 2013). به طور کلی تکثیر پالونیا از طریق قلمه های ساقه دشوارتر از قلمه های ریشه است، اما ریشه ها نیز به دمای بالا و حمله توسط ارگاناسم های بیماری زا حساس بوده و در صورت آسیب فیزیکی به اپیدرم و پوست یا بشره ریشه رشد آنها با مشکل روبرو می شود (Tang et al., 1980, Desai et al., 2015). از این رو تکثیر سنتی پالونیا چندان موفق آمیز نیست و به دلیل کارایی پایین تولید

پالونیا شان تونگ (*Paulownia shantong*) یکی از مهم ترین گونه های درختی و اقتصادی دنیاست. این گیاه دولپه ای ($2n=2x=40$)، گل دار متعلق به تیره گل میمون Scrophulariaceae و بومی چین و ژاپن است. این درخت بسیار تندرشد بوده و به عنوان درخت امپراتور شناخته می شود (Ayan and Bilir, 2006). پالونیا شامل نه گونه از درختان با حجم چوب دهی مناسب است که به طور طبیعی و زراعی در مناطق مختلفی از چین، ژاپن و آسیای جنوب شرقی، اروپا، آمریکای شمالی و مرکزی و استرالیا رشد می کند. گونه های این جنس به شدت انعطاف پذیر و با تغییرات محیطی سازگار بوده و به خوبی در زمین های حاشیه ای رشد می کنند. این گونه های جنگلی به دلیل تولید چوب بالا می توانند به عنوان یک منبع عالی از مواد خام برای صنعت سوخت های زیستی مورد استفاده قرار گیرند (Bergman, 1998, Wang and Shogren, Melhuish et al., 1990, 1992).

در شرایط عادی، یک درخت پالونیای ده ساله به اندازه ۳۰ تا ۴۰ سانتی متر قطر داشته و حجم چوب دهی آن پنج و سه دهم مترمکعب در سال است. در شرایط مطلوب محیطی، طی پنج-شش سال چوب پالونیا قابل بهره برداری است (Jimenez et al., 2005). این جنس دارای قابلیت بالقوه برای جنگلداری و رشد در خاک های فقیر است (Melhuish et al., 1990). چوب پالونیا برای تولید نئوپان، کبریت سازی، کاغذ و کارتون سازی، لایه بری، مبل سازی، تولید ابزار موسیقی، جعبه دارو و ساخت لوازم تزئینی و صدها مصارف دیگر استفاده می شود (Hassanabbasi et al., 1998). از پالونیا برای توسعه فضای سبز، ایجاد پارک و کشت توأم با انواع گیاهان زراعی در بسیاری از کشورها به صورت موفق به کار گرفته شده است

سطح یک میلی‌گرم در لیتر در رقم *Paulowna elongate* بالاترین مقدار تکثیر را داشت (Clapa et al., 2014).

در کشت بافت *Paulownia tomentosa* ترکیب تیمار تنظیم‌کننده رشد BAP، KIN و NAA به تنهایی یا در ترکیب‌های مختلف برای القای ریشه‌زایی و باززایی به‌کار رفته است، نتایج نشان داد که در محیط کشت MS با ترکیب تنظیم‌کننده رشد BAP دونیم میلی‌گرم در لیتر و IAA پنج‌دهم میلی‌گرم در لیتر از هر نمونه کشت شده با میانگین هفت و چهاردهم ساقه با طول پنج و شیش دهم سانتی‌متر، در حالی که در محیط کشت MS با ترکیب تیمار تنظیم‌کننده رشد نیم میلی‌گرم در لیتر IAA و سه میلی‌گرم در لیتر KIN در هر ریزنمونه کشت شده با میانگین شش و شش دهم ساقه و با طول پنج و بیست و دو صدم سانتی‌متر مشاهده شد (Rahmatullah and Rahman, 2013).

متأسفانه در سال‌های اخیر برداشت بی‌رویه از درختان جنگلی برای تامین نیاز صنایع منجر به از بین رفتن درختان بومی مانند صنوبر، چنار، ارس، سرخدار و بلوط شده است، از آنجایی که پالونیا یکی از درختان تندرشد دنیا با کیفیت مطلوب چوب برای صنایع چوب، آرایشی، تزئینی، مصارف دارویی و صدها مصارف دیگر است تکثیر آن با روش‌های کشت بافت سبب می‌شود که ضمن صرفه جویی ارزی امکان تکثیر و تامین نشاء آنها در سراسر کشور را فراهم آورد. از این‌رو هدف از این پژوهش، بررسی پینه‌زایی، جنین‌زایی و ریزازدیادی پالونیا سنگ‌تونگ به‌منظور تکثیر تجاری و استفاده در برنامه‌های به‌نژادی بود.

مواد و روش‌ها

برای بررسی القای پینه، جنین‌زایی و باززایی در درخت پالونیا وارسته‌ی سنگ‌تونگ، آزمایشی در سال

در واحد سطح، حساسیت به آفات و بیماری‌ها، جوانه‌زنی ضعیف و رشد آهسته بذر توصیه نمی‌شود (San Jose et al., Bergmann and Moon, 1997). از سوی دیگر، تکثیر رویشی پالونیا عاملی مهم برای جنگلداری این گونه بوده و دارای مزایای بسیاری نسبت به تولید نهال‌های حاصل از بذر است. کشت بافت گیاهی به عنوان یکی از ابزارهای مهم تکثیر غیرجنسی می‌تواند عاری از مشکلات تکثیر غیرجنسی این گیاه از طریق قلمه باشد. القای جنین‌های رویشی که به‌طور مستقیم از بافت‌های بالغ درخت یا حداقل از بافت‌های غیر بذر مانند اندام‌های برگ و یا بخش‌های ساقه گرفته می‌شود اهدافی مهم در کشت بافت گونه‌های جنگلی است (Cuenca et al., 1999).

براساس گزارش Guo-qiang و همکاران (2001) تا سال انتشار مقاله این پژوهشگران پژوهش برجسته‌ای روی جنین‌زایی و باززایی گیاه پالونیا گزارش نشده بود. این پژوهشگران دریافتند که مقدار القای بافت پینه برگ در *Paulowna fortunei* و *Paulowna tomentosa* در محیط کشت MS دارای بیشترین باززایی و در محیط کشت‌های B5 و PC کمترین باززایی را داشت، درحالی‌که در محیط کشت NS القای این بافت صفر بوده است. Ipekci و همکاران (2001) نشان دادند که باززایی از میانگرها در محیط کشت حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر BAP و پنج‌دهم میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشتر از برگ و برگ به همراه دم‌برگ بوده است، در عین حال در دیگر گونه‌های *Paulownia* کارایی باززایی زمانی که برگ‌ها دارای دم‌برگ بودند بیشتر از عدم وجود دم‌برگ بود. در بررسی به‌منظور ریزازدیادی پالونیا از دو رقم *Paulowna elongate* و *Paulowna fortunei* در محیط کشت MS با ترکیب تنظیم‌کننده رشد BAP در سطوح یک، هفت‌دهم و پنج دهم میلی‌گرم در لیتر آزمایشی انجام شد و نتایج نشان داد که جوانه‌زایی در

مربعی و دمبرگ نیز به اندازه ۱ سانتی متر تهیه شدند. محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و ترکیبات تنظیم کننده رشد مربوطه طبق (جدول ۱) آماده و pH آنها ۵/۸ تنظیم شد.

در محیط کشت هشت (MS_{A/4} & 1/2) منظور از A/4 و 1/2 به ترتیب، استوک A که شامل عناصر ماکرو است در محیط کشت، چهار برابر و استوک B، C و D دو برابر کاهش یافته است. استریل کردن محیط کشت ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه و فشار یک و نیم اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از دو عامل، ریزنمونه (برگ، دمبرگ و جوانه جانبی) و هشت نوع محیط کشت حاوی ترکیبات مختلف تنظیم کننده رشد (جدول ۱) و در پنج تکرار صورت پذیرفت. هر پتری دیش به عنوان یک تکرار و داخل هر کدام پنج ریزنمونه کشت شد.

۱۳۹۷ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان-دانشگاه تهران انجام شد. ریزنمونه های برگ، دمبرگ و جوانه جانبی از نهال های شش ماهه جوان و سالم پالونیا تهیه شد. ریزنمونه ها برای ضد عفونی در محلول قارچ کش کاپتان دو گرم در لیتر حاوی چهار قطره تویین ۶۰ به مدت ۱۵ دقیقه غوطه ور شدند.

در مرحله بعد، ریزنمونه ها درون الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس ریزنمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه درون محلول هیپوکلرید سدیم ۲ درصد قرار داده شدند و ظرف حاوی آنها به زیر هود لامینار منتقل شد. بعد از اتمام مدت زمان مزبور، ریزنمونه ها سه مرتبه با آب مقطر دوبار استریل شستشو و برای دفع آب اضافی، روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. باید اشاره کرد که ریزنمونه های برگ به صورت دیسک های یک سانتی متر

جدول ۱- محیط های کشت حاوی ترکیبات مختلف تنظیم کننده رشد مورد استفاده در کشت بافت پالونیا

Table 1. Medium containing different growth regulator compositions used in *Paulownia* tissue culture

محیط کشت Medium	2.4-D (mg/l)	TDZ (mg/l)	KIN (mg/l)	BAP (mg/l)	GA3 (mg/L)	ردیف Row
MS	0.3	2				1
A ₂ MS	0.3	2				2
MS	0.5		0.5			3
1/2 MS	0.5		0.5			4
MS	0.3		2	4	0.30	5
A ₂ MS	0.3		2	4	0.30	6
1/2MS	0.3		2	4	0.30	7
1/2&A/4 MS	0.3		2	4	0.30	8

سرعت پینه زایی، درصد پینه زایی، مساحت پینه، درصد پینه های جنین زا و درصد باززایی اندازه گیری شد. برای اندازه گیری مساحت پینه از نرم افزار Digimizer استفاده شد (Bahmankar et al., 2017). واكشت ریزنمونه ها هر ۴ هفته یکبار در محیط کشت جدید صورت گرفت.

ریزنمونه های کشت شده در اتاقک رشد و در دمای ۲۴-۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور ۲۷۲۰ لوکس نگهداری شدند. پس از حدود سه هفته علائم پینه زایی در پتری ها مشاهده شد. سپس پینه ها به مدت دو هفته به تاریکی منتقل و در انتهای این دوره خصوصیات ماند

پس از باززایی گیاهچه‌ها به منظور القایی ریشه‌زایی در آنها، آزمایشی بصورت فاکتوریل با سه عامل محیط کشت (MS کامل و 1/2 MS)، نوع تنظیم‌کننده رشد (IAA و NAA، IBA) و غلظت‌های تنظیم‌کننده رشد

(یک میلی‌گرم در لیتر و یک و نیم میلی‌گرم در لیتر) طبق (جدول ۲) و بر مبنای طرح بلوک کامل تصادفی با پنج تکرار صورت پذیرفت.

جدول ۲- محیط‌های کشت (MS کامل و 1/2 MS) حاوی غلظت‌های مختلف ترکیب تنظیم‌کننده رشد NAA، IBA و IAA برای القای ریشه‌زایی

Table 2. Medium (complete MS and 1/2 MS) containing different concentrations of growth regulator composition NAA, IBA and IAA for rooting induction

ترکیبات تنظیم‌کننده رشد (میلی‌گرم بر لیتر) Growth regulator composition (mg/l)	1	2	3	4	5	6
NAA	1	1.5				
IBA			1	1.5		
IAA					1	1.5

میلی‌لیتر حاوی پرلایت و ماسه و کوکوپیت به نسبت ۱:۱:۱ استریل شده منتقل شدند و روی گیاهچه‌ها برای حفظ رطوبت یه پلاستیک گذاشته شد و به مدت ۴ تا ۵ روز در رطوبت نسبی حدود ۹۰ درصد در گلخانه با دمای بین ۲۰ تا ۱۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس ۳ تا سوراخ کوچک روی این پلاستیک ایجاد کردیم تا سطح رطوبت نسبی به حدود ۵۵ درصد کاهش پیدا کند و گیاهان حدود ۳ هفته در این شرایط قرار گرفتند. در مرحله‌ی آخر به گلدان‌ها جهت خروج از گلخانه، منتقل شدند.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ریزنمونه و اثر متقابل آن با محیط کشت به جز صفت باززایی جنین‌های رویشی برای دیگر صفات شامل درصد پینه‌زایی، زمان القای پینه، مساحت پینه‌دهی و درصد پینه جنین‌زا در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شد. تاثیر محیط کشت روی همه صفات در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شد. (جدول ۴).

گیاهچه‌های کشت شده به مدت سه هفته در اتاقک رشد در شرایط دمایی ۲۴±۲ و نور مناسب نگهداری و پس از سه هفته درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و تعداد ریشه اندازه‌گیری شد و بهترین محیط ریشه‌زایی شناسایی شد. پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه دانکن (DMRT, P ≤ 0.05 & P ≤ 0.01) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ver. 9.2 انجام شد.

سازگاری گیاهچه

ابتدا ظروف حاوی گیاهان در داخل بن‌ماری به مدت ۳ دقیقه با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا ژل محیط کشت سست شود و هنگام خارج کردن نمونه‌ها از ظروف کشت صدمه‌ای به ریشه آنها وارد نشود، سپس به زیر هود لامینار برده شد، گیاه به کمک پنس بیرون آورده شد و با آب استریل شسته شد و به طور کامل ژل آن کاملاً از ریشه تمیز شد. پس از شسته شدن ژل از ریشه، گیاهان به داخل گلدان‌هایی به حجم ۵۰۰

جدول ۴- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات اندازه گیری شده در بررسی کشت بافت پالونیا

Table 4. Analysis of variance (mean squares) of measured traits in scrutiny Paulownia medium

باززایی جنین‌های رویشی (درصد) Regeneration of somatic embryogenesis (%)	پینه جنین‌زا (درصد) Callus embryogenesis (%)	مساحت پینه‌دهی (سانتی‌متر) callus rate (cm)	زمان القای پینه (روز) time of induction callus (day)	القای پینه‌زایی (درصد) Induction callus (%)	درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variation
308.0 ^{ns}	2560.9 ^{**}	7.2 ^{**}	562.9 ^{**}	6203.3 ^{**}	2	ریزنمونه Explant
14695.6 ^{**}	18436.1 ^{**}	20.5 ^{**}	452.5 ^{**}	8510.0 ^{**}	7	محیط کشت Medium ریزنمونه ×
588.6 ^{ns}	1163.3 ^{**}	1.3 ^{**}	156.9 ^{**}	2321.4 ^{**}	14	محیط کشت Medium Explant ×
1291.96	477.48	0.41	45.90	186.66	96	خطا Error

*** و ns به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمالی ۱ درصد و عدم وجود تفاوت معنی دار.

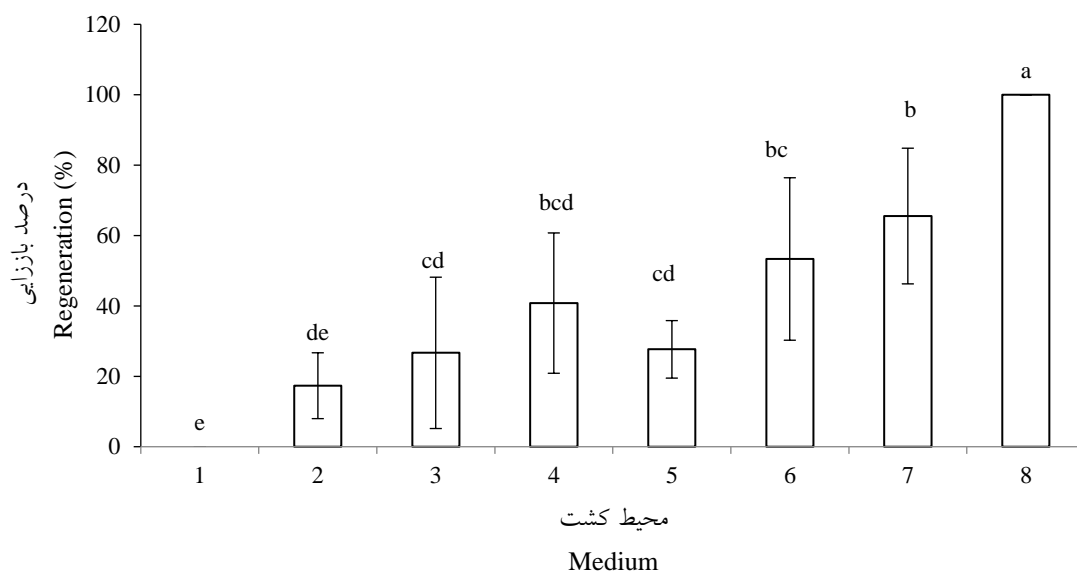
ns and ** non-significant and significant at 0.01 respectively

این پژوهش بیشترین مقدار تولید پینه در جوانه جانبی با کد تیماری ۳۸ و کمترین در کد تیماری ۳۱ مشاهده شد و زمانی که در کد تیماری ۳۸ مقدار نمک‌های معدنی چهار برابر کاهش یافت (A/4)، درصد القای پینه در ریزنمونه جوانه جانبی افزایش یافت. همچنین کوتاه‌ترین زمان القای پینه در بین سه ریزنمونه (برگ، دمبرگ و جوانه جانبی) مربوط به کد تیماری ۲۴، هفت روز است. مشخص شد کاهش مواد معدنی همراه با برابر شدن مقادیر ترکیب تنظیم کننده رشد اکسین (-2.4 D) و سیتوکنین (KIN) در گیاه پالونیا سبب کاهش فاصله زمان القای پینه می‌شود. نتایج نشان داد که بیشترین مساحت پینه مربوط به ریزنمونه دمبرگ با ۳/۶ سانتی‌متر است. مساحت پینه در ریزنمونه دمبرگ بطور یکسان در محیط‌های کشت ۱/۲ MS افزایش پیدا کرد. همچنین در ریزنمونه برگ، بالاترین مساحت در کد تیماری ۲۴ و ۲۸ و در ریزنمونه جوانه جانبی، بالاترین مساحت با کد ۳۸ و ۳۴ مشاهده شد. طبق پژوهش‌های

نتایج حاصل از مقایسه میانگین محیط کشت‌های پایه ۱/۲ MS، A/2 MS، ۱/۲ MS و MS کامل و ریزنمونه (دمبرگ، برگ و جوانه جانبی) مورد بررسی بر روی صفات اندازه‌گیری شده شامل درصد پینه‌زایی، زمان القای پینه (روز)، مساحت پینه‌دهی (سانتی‌متر)، پینه جنین‌زا و درصد باززایی جنین‌های رویشی در (جدول ۵) نشان داده شده است. بررسی‌ها نشان داد که بیشترین درصد پینه‌زایی برای ریزنمونه دمبرگ با کد تیماری ۱۸ و کمترین با کد تیماری ۱۱ مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری بین آنها دیده نمی‌شود. با کاهش ترکیبات معدنی در محیط کشت، درصد پینه‌زایی از ریزنمونه دمبرگ افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین درصد القای پینه‌زایی در ریزنمونه برگ با کدهای تیماری ۲۳، ۲۴ و ۲۸ ایجاد می‌شود و تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. کد تیماری ۲۳ و ۲۴ نشان می‌دهد که درصد القای پینه‌زایی در ریزنمونه برگ در دو محیط (MS کامل و ۱/۲ MS) یکسان است. طبق

مغذی کاهش و محیط MS کامل به MS 1/2 تبدیل شد، بیشترین درصد پینه جنین‌زا در آنها مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داد در کد تیماری ۱۱، ۲۱، ۲۲ و ۳۱، درصد باززایی جنین‌های رویشی صفر شد به عبارت دیگر تولید گیاهچه مشاهده نشد. بالاترین درصد باززایی جنین رویشی در کد ۱۶، ۱۷ و ۱۸ مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت. در این پژوهش در کد تیماری ۲۸ و ۲۷ بالاترین درصد باززایی جنین‌های رویشی به وقوع می‌پیوندد. در ریزنمونه جوانه جانبی، بیشترین باززایی در کد تیماری ۳۸ مشاهده شد. باید اشاره کرد که مهم‌ترین عوامل تاثیر گذار بر روی درصد القای پینه و درصد پینه جنین‌زا، نوع محیط کشت و ریزنمونه است.

انجام شده در کد تیماری ۱۱، ۲۱ و ۳۱، درصد پینه جنین‌زا صفر بود. لازم به ذکر است که زمانی که محیط کشت MS، کامل و نمک‌های معدنی نصف نشده بودند پینه‌ها قبل از رفتن به مرحله جنینی، کلروز و نکروزه شدیدی نشان دادند بیشترین درصد پینه جنین‌زا در ریزنمونه برگ با کد تیماری ۲۴، ۲۷ و ۲۸ حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. شایان ذکر است که میانگین ریزنمونه‌های برگ نسبت به میانگین ریزنمونه‌های دم‌برگ و جوانه جانبی بیشترین درصد پینه جنین‌زا را به خود اختصاص داده است. در کد تیماری ۳۸، همه‌ای پینه‌ها جنین‌زا شد و اختلاف معنی‌داری با بقیه محیط‌های کشت ریزنمونه دم‌برگ نشان داد (جدول ۷). در محیط‌هایی که عناصر درشت



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد باززایی جنین‌های رویشی از میانگین سه ریزنمونه برگ، دم‌برگ و جوانه جانبی در محیط‌های کشت مورد بررسی.

Figure 1. Comparison of mean regeneration percentage of somatic embryogenesis from mean three explants petiole, leaf and axillary bud in the studied culture medium.

جدول ۵- مقایسه میانگین ریزنمونه و محیط‌های کشت برای القای پینه‌زایی (درصد)، زمان القای پینه (روز)، مساحت پینه‌دهی (سانتی‌متر)، پینه جنین‌زا (درصد) و باززایی جنین‌های رویشی (درصد) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵

Table 5. Comparison of the mean of explant and mediums for induction callus (%), time of induction callus (day), callus rate (cm), callus embryogenesis (%) and regeneration of somatic embryo (%) using Duncan test at level 0.05

باززایی جنین‌های رویشی (درصد) Regeneration of somatic embryogenesis (%)	پینه جنین‌زا (درصد) Callus embryogenesis (%)	مساحت پینه دهی (cm) Callus rate (cm)	زمان القای پینه (روز) Time of induction callus (day)	القای پینه‌زایی (درصد) Induction callus (%)	مشخصات کد تیمار به ترتیب از راست به چپ Specification of the treatment code from right to left	کد تیماری Code treatment	row
0 ^b	0 ^d	0.7 ^d	30 ^a	20 ^e	محیط کشت +1 دمبرگ Medium1 + Petiole	11	1
8 ^b	16 ^{cd}	1.2 ^d	24.6 ^a	68 ^{bc}	محیط کشت +2 دمبرگ Medium2 + Petiole	12	2
40 ^b	13 ^{cd}	2.3 ^c	20 ^b	40 ^b	محیط کشت +3 دمبرگ Medium3 + Petiole	13	3
36.4 ^b	50 ^b	3.1 ^b	12 ^b	64 ^{bc}	محیط کشت +4 دمبرگ Medium4 + Petiole	14	4
33 ^b	32 ^{bc}	2.3 ^c	28 ^a	60 ^c	محیط کشت +5 دمبرگ Medium5 + Petiole	15	5
60 ^a	50 ^b	2.8 ^{bc}	30 ^a	40 ^b	محیط کشت +6 دمبرگ Medium6 + Petiole	16	6
70 ^a	85 ^a	3.2 ^{ab}	23 ^a	80 ^{ab}	محیط کشت +7 دمبرگ Medium7 + Petiole	17	7
100 ^a	100 ^a	3.6 ^a	17 ^b	92 ^a	محیط کشت +8 دمبرگ Medium8 + Petiole	18	8
0 ^c	0 ^c	0.3 ^d	10 ^d	4 ^d	محیط کشت +1 برگ Medium1 + leaf	21	9

ادامهٔ جدول ۵.

Continued table 5.

باززایی جنین‌های رویشی (درصد) Regeneration of somatic embryogenesis (%)	پینه جنین‌زا (درصد) Callus embryogenes (%)	مساحت پینه دهی (cm) Callus rate (cm)	زمان القای پینه (روز) Time of induction callus (day)	القای پینه‌زایی (درصد) Induction callus (%)	مشخصات کد تیمار به ترتیب از راست به چپ Specification of the treatment code from right to left	کد تیماری Code treatment	row
0 ^c	4 ^c	0.8 ^d	8 ^d	8 ^d	محیط کشت +2 برگ Medium2 + leaf	22	10
20 ^c	12 ^c	2.7 ^b	15 ^c	100 ^a	محیط کشت +3 برگ Medium3 + leaf	23	11
36 ^{bc}	100 ^a	4.6 ^a	7 ^d	100 ^a	محیط کشت +4 برگ Medium4+ leaf	24	12
30 ^c	50 ^d	1.7 ^c	24 ^b	32 ^c	محیط کشت +5 برگ Medium5 + leaf	25	13
50 ^b	66 ^d	3.4 ^b	29 ^a	40 ^c	محیط کشت +6 برگ Medium6 + leaf	26	14
70 ^{ab}	88 ^a	2.9 ^b	19 ^{bc}	68 ^b	محیط کشت +7 برگ Medium7 + leaf	27	15
100 ^a	100 ^a	4.5 ^a	13 ^{cd}	96 ^a	محیط کشت +8 برگ Medium8 + leaf	28	16
0 ^c	0 ^{bc}	0.3 ^c	20 ^b	12 ^c	محیط کشت +1 جوانه جانبی Medium1 + Axillary bud	31	17
44 ^{bc}	30 ^c	1.1 ^b	30 ^a	40 ^b	محیط کشت +2 جوانه جانبی Medium2 + Axillary bud	32	18
20 ^c	6 ^b	1 ^{bc}	10 ^c	24 ^{bc}	محیط کشت +3 جوانه جانبی Medium3 + Axillary bud	33	19
50 ^b	26 ^{bc}	3 ^a	14 ^c	40 ^b	محیط کشت +4 جوانه جانبی Medium4 + Axillary bud	34	20

ادامه جدول ۵.

Continued table 5.

باززایی جنین‌های رویشی (درصد) Regeneration of somatic embryogenesis (%)	پینه جنین‌زا (درصد) Callus embryogenes (%)	مساحت پینه دهی (cm) Callus rate (cm)	زمان القای پینه (روز) Time of induction callus (day)	القای پینه‌زایی (درصد) Induction callus (%)	مشخصات کد تیمار به ترتیب از راست به چپ Specification of the treatment code from right to left	کد تیماری Code treatment	row
20 ^c	16 ^b	1.6 ^b	31 ^a	36 ^b	محیط کشت +5 جوانه جانبی Medium5 + Axillary bud	35	21
50 ^b	50 ^c	1.4 ^b	18 ^{bc}	16 ^c	محیط کشت +6 جوانه جانبی Medium6 + Axillary bud	36	22
56.6 ^{ab}	63 ^b	2.6 ^a	24 ^{ab}	36 ^b	محیط کشت +7 جوانه جانبی Medium7 + Axillary bud	37	23
100 ^a	100 ^a	3.1 ^a	20 ^b	80 ^a	محیط کشت +8 جوانه جانبی Medium8 + Axillary bud	38	24

GA3 مشاهده شد، همچنین جنین‌های که رنگ سبز روشن داشتند بیشترین باززایی را به خود اختصاص دادند (شکل ۲-۳). بالاترین درصد جنین‌های قلبی شکل در ریزنمونه دمبرگ بر روی محیط کشت $\frac{1}{2} \& A/4 \text{ MS} + 0.3 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 2 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 4 \text{ mg/l KIN} + 0.30 \text{ mg/l GA3}$ (شکل ۲-۲) تشکیل شدند (شکل ۲-۲). گیاهچه‌های که در محیط کشت $\frac{1}{2} \& A/4 \text{ MS} + 0.3 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 2 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 4 \text{ mg/l KIN} + 0.30 \text{ mg/l GA3}$ بدست آمده بودند، برگ‌های سالم‌تر و شاداب‌تری داشتند (شکل ۲-۵). پس از گذشت دو هفته تشکیل جنین‌زای رویشی، برگ‌های اولیه از جنین‌های رویشی بالا آمدند (شکل ۲-۶).

بیشتر پینه‌های که از ریزنمونه برگ و دمبرگ بر روی محیط کشت $\text{MS} + 0.30 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 2 \text{ mg/l TDZ}$ مشاهده شدند، غیرجنین‌زا بودند و پینه‌ها رنگ سفید برفکی (سفید پودری)، شکننده و سوختگی بالایی داشتند (شکل ۲-۱). القای پینه‌های که بر روی محیط کشت $\frac{1}{2} \& A/4 \text{ MS} + 0.3 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 2 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 4 \text{ mg/l KIN} + 0.30 \text{ mg/l G3}$ در ریزنمونه برگ به دست آمدند، سالم، شاداب و از سوختگی پایینی برخوردار بودند و پینه‌ها به جنین رویشی تبدیل شدند (شکل ۲-۲). باززایی جنین‌های رویشی در ریزنمونه دمبرگ بر روی محیط کشت $\frac{1}{2} \& A/4 \text{ MS} + 0.3 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 2 \text{ mg/l } 2.4\text{-D} + 5 \text{ mg/l KIN} + 0.30 \text{ mg/l}$



شکل ۲- ۱. پینه‌های جنین‌زا از ریزنمونه برگ در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS + 0.3 mg/l 2,4-D + 2 mg/l TDZ + 4 mg/l Kin + 0.30 mg/l GA3 ۲. پینه غیر جنین‌زا در محیط کشت MS + 0.3 mg/l 2,4-D + 2 mg/l TDZ ۳. باززایی جنین‌ها از پینه‌های جنین‌زا MS+ ۴. مراحل جنین‌های قلبی شکل از ریزنمونه دمبرگ ۵- گیاهچه باززا شده. ۶- مشاهده مرحله دو برگی از جنین‌های باززا شده.

Figure 2. 1- Callus embryogenic of explant leaf in medium $\frac{1}{2}$ MS + 0.3mg/l 2,4-D+2mg/l TDZ + 4mg/l Kin+0.30 mg/l GA3 2- Non callus embryogenic in the medium MS + 0.3mg/l 2,4-D+2mg/l TDZ 3- Embryo regeneration from callus embryonic 4- Processes of heart embryos from explant petiole 5- Regenerated seedlings. 6- Dicotyledonous stage of regeneration embryos is observed.

از آن بود که اثر متقابل سه گانه محیط کشت MS، غلظت تنظیم کننده رشد و نوع تنظیم کننده رشد بر روی آن‌ها در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۶).

مقایسه میانگین القایی ریشه‌زایی نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی شامل درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و تعداد ریشه حاکی

جدول ۶- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده برای ریشه‌زایی پالونیا

Table 6. Analysis of variance of measured traits for *Paulownia* induction rooting

تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)	ریشه‌زایی (درصد)	df	منبع تغییرات Source of variation
Root number	Length root (cm)	Rooting (%)		
114.81**	16.20**	10935.00**	1	محیط کشت Medium
0.15**	4.10**	201.66**	1	غلظت تنظیم کننده رشد Growth regulator concentration
98.61**	29.97*	18185**	2	نوع تنظیم کننده رشد Growth regulator type
2.81**	5.34**	201.68**	1	محیط کشت × غلظت تنظیم کننده رشد Growth regulator concentration × Medium
35.61**	3.55**	185**	2	محیط کشت × نوع تنظیم کننده رشد Medium × Hormone type
43.55**	5.75**	1481.68**	2	غلظت تنظیم کننده رشد × نوع تنظیم کننده رشد Growth regulator concentration × Growth regulator type
17.81**	4.73**	161.63**	2	محیط کشت × غلظت تنظیم کننده رشد × نوع تنظیم کننده رشد Growth regulator type × Growth regulator concentration × Medium
3.77	0.09	15	48	خطا Error

IAA درصد ریشه‌زایی به ۵۸ و ۷۰ درصد رسید. در حالی که در محیط کشت ۱/۲ MS با ترکیب تیمار تنظیم-کننده رشد IBA نسبت به ترکیب تیمار تنظیم‌کننده رشد NAA و IAA درصد ریشه‌زایی به ۹۰ و ۱۰۰ رسید. همچنین ریشه‌هایی که در دو محیط کشت (MS کامل و ۱/۲ MS) همراه با ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IBA رشد کردند کیفیت بالایی داشتند و با افزایش غلظت IBA درصد ریشه‌زایی افزایش پیدا کرد. این پژوهش نشان می‌دهد در ترکیب تیماری تنظیم کننده رشد NAA بالاترین میانگین ریشه‌زایی (۵۲ درصد) درکد تیماری ۲۱۲ مشاهده شد و اختلاف معنی داری با کد ۲۲۲ دارد همچنین می‌توان دریافت که با افزایش غلظت تنظیم-کننده رشد NAA، درصد ریشه‌زایی کاهش می‌یابد. ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IAA در محیط کشت ۱/۲ MS بیشترین ریشه‌زایی را با میانگین (۵۰ درصد) داشت

با توجه به اینکه که اثرهای متقابل در جدول تجزیه واریانس معنی دار شده است، بنابراین از ذکر اثرهای اصلی خودداری شده است. نتایج حاصل از مقایسه میانگین مورد بررسی بر روی صفات درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و تعداد ریشه در (جدول ۷) درج شده است. اثرکسین‌های مختلف NAA، IAA و IBA با دو نوع غلظت (۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) در دو محیط کشت MS کامل و ۱/۲ MS مجزا از هم برای القای ریشه‌زایی گیاه *Paulownia shantong* تهیه و آزمایش شدند. نتایج نشان داد که گیاهچه‌های که برای القای ریشه‌زایی در محیط MS کامل قرار گرفت در مقایسه با گیاهچه‌های که بر روی محیط کشت ۱/۲MS، کشت شده بودند ریشه‌ی کمتری داشتند. بررسی‌ها نشان داد که در محیط کشت MS کامل با ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IBA، نسبت به ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد NAA و

محیط MS ½ همراه با ترکیب تیماری تنظیم کننده رشد IBA (۱/۵ میلی گرم در لیتر) دیده شد. با افزایش غلظت تیمار تنظیم کننده رشد IBA تعداد ریشه افزایش پیدا کرد. شایان ذکر است ریشه‌های که با ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IBA تشکیل شد کیفیت بالاتری داشتند. این پژوهش نشان می‌دهد که کد تیماری ۲۱۲ بعد از کد تیماری ۲۲۱ دارای بیشترین تعداد ریشه است و با افزایش غلظت NAA تعداد ریشه کاهش می‌یابد.

با افزایش غلظت IAA درصد ریشه‌زایی افزایش یافته است. بررسی‌ها نشان داد که در محیط کشت MS ½ همراه با تنظیم کننده رشد NAA با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر بیشترین میانگین طول ریشه (۴/۸ سانتی‌متر) شد. شایان ذکر است که با افزایش غلظت NAA، طول ریشه افزایش پیدا کرد، لازم به ذکر است که ریشه‌های تشکیل شده در ترکیب تنظیم کننده رشد NAA (محیط کشت MS کامل و MS ½) دارای کیفیت پایینی بودند. طبق بررسی‌های انجام‌شده، بالاترین تعداد ریشه در



شکل ۳- ریشه‌زایی پالونیا شان‌تونگ در محیط کشت MS ½ همراه با ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IBA با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر

Figure 3. Rooting of *Paulownia shantong* in MS medium with a combination of IBA growth regulator treatment at a concentration of 1.5 mg / L

جدول ۷- مقایسه میانگین القایی ریشه‌زایی برای درصد ریشه‌زایی، طول ریشه‌زایی (سانتی‌متر)، تعداد ریشه، با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

Table 7. Comparison of rooting induction mean for percentage rooting, root length (cm), root number, using Duncan test at levels of 0.05 and 0.01

تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی‌متر)	ریشه‌زایی (درصد)	مشخصات کد تیمار از راست به چپ Specification of the treatment code from right to left	کد تیماری Treatment code
Root number	Length root (cm)	Rooting (%)		
محیط کشت MS کامل Medium MS complete				
3.2 ^{ab}	0.7 ^d	58 ^b	محیط کشت MS کامل + IBA +1 mg/l	111
6.2 ^a	1.1 ^c	34 ^c	محیط کشت MS کامل + NAA +1 mg/l	112
1 ^c	0.1 ^c	4 ^f	محیط کشت MS کامل + IAA +1 mg/l	113
4.8 ^a	2 ^b	70 ^a	محیط کشت MS کامل + IBA +1.5 mg/l	121

ادامه جدول ۷.

Continued table 7.

تعداد ریشه	طول ریشه (سانتی متر)	ریشه‌زایی (درصد)	مشخصات کد تیمار از راست به چپ	کد تیماری
Root number	Length root (cm)	Rooting (%)	Specification of the treatment code from right to left	Treatment code
5.4 ^a	2.8 ^a	16 ^d	محیط کشت MS کامل + NAA 1.5 mg/l	122
1.8 ^{bc}	0.4 ^{dc}	10 ^e	محیط کشت MS کامل + IAA 1.5 mg/l	123
محیط کشت ½ MS Medium ½ MS				
8.8 ^a	3 ^b	90 ^b	محیط کشت IBA + 1 mg/l + ½ MS	211
9 ^a	1.3 ^b	52 ^c	محیط کشت NAA + 1 mg/l + ½ MS	212
2.2 ^c	0.7 ^c	24 ^f	محیط کشت IAA + 1 mg/l + ½ MS	213
10.4 ^a	0.8 ^c	100 ^a	محیط کشت IBA + 1.5 mg/l + ½ MS	221
3.2 ^{bc}	4.8 ^a	38 ^e	محیط کشت NAA + 1.5 mg/l + ½ MS	222
5.4 ^b	0.9 ^c	50 ^d	محیط کشت IAA + 1.5 mg/l + ½ MS	223

بحث
اثرهای معنی‌دار ریزنمونه‌های گیاهی و ترکیبات تنظیم کننده رشدهای متفاوت بر روی خصوصیات پینه‌زایی، جنین‌زایی و باززایی در دیگر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است (Bahmankar et al., 2017). بنا بر گزارش‌های Karimi و همکاران (2010) مقادیر ترکیب تنظیم کننده رشد و محیط کشت از عوامل تاثیر گذار بر القای پینه‌زایی است. در این بررسی محیط کشت نقش مهمی در القای پینه‌زایی داشت. بررسی‌ها نشان داد که بیشترین درصد القای پینه در ریزنمونه دم‌برگ، جوانه‌جانبی در محیط کشت هشت و در ریزنمونه برگ در محیط کشت هشت، سه و چهار مشاهده شد با این اوصاف تفاوت معنی‌داری بین این سه محیط کشت در ریزنمونه برگ مشاهده نشد.

بر اساس گزارش Tiwari and Chaturvedi (2018) در گیاه *Anthurium andraeanum* بر اساس گزارش Aawath and Satyan (2018) بیشترین القای پینه در ریزنمونه برگ و محیط کشت ½ MS که حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2.4-D به ترتیب با غلظت‌های ۴/۴ و ۱/۴ میکرومولار مشاهده شد. نتایج پژوهش‌های Tiwari and Chaturvedi (2018) نشان داد که کوتاه‌ترین زمان (۲۷ روز) القای پینه در ریزنمونه برگ در ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد MS + 1 mg/l

بر اساس گزارش Tiwari and Chaturvedi (2018) در گیاه *(Polygonatum verticillatum)* در دو محیط (MS کامل و ½ MS) با ترکیب تنظیم کننده رشد 1 mg/l

در گزارشی Hussain و همکاران (2013) بر روی درخت سرخدار *Taxus wallichiana* Zucc بالاترین باززایی در ریزنمونه برگ، بر روی محیط کشت MS کامل با ترکیب تنظیم‌کننده رشد ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. به نظر می‌رسد بافت برگ و دم‌برگ درخت پالونیا عناصر کمتری دارد. اندام هوایی (برگ و دم‌برگ) درخت پالونیا شامل درصد بالای از عناصر میکرو و ماکرو است (Zhu et al., 1986).

در پژوهشی بر روی درخت *Averrhoa carambola*، بالاترین باززایی در ریزنمونه جوانه جانبی (۵/۸) بر روی محیط کشت MS ۱/۲ همراه با ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر BAP، نسبت به محیط کشت B5 ۱/۲ داشت (Koli et al., 2009). در گزارشی نشان داده شد که محیط DKW ۱/۲ همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای باززایی پسته مناسب بود (Minghao et al., 2011).

در پژوهشی روی تکثیر درون شیشه‌ای (*Pistacia vera*) بیشترین نتیجه را در محیط MS حاوی ۴/۴ میکرومولار BA مشاهده کردند (Tilkat et al., 2009) که با یافته‌های این بررسی هم‌خوانی ندارد. همچنین تکثیر درون شیشه‌ای درخت مقاوم به خشکی *Celtis caucasica* مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip برای استقرار و شاخه‌زایی مناسب است که با یافته‌های این بررسی هم‌خوانی ندارد (Dadvar et al., 2013). پژوهشگران اظهار کردند که تاثیر تنظیم‌کننده رشد خارجی در سلول‌ها و بافت‌های کشت‌شده، تعیین‌کننده جنین‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های کشت شده است (Tawfik et al., 2002).

القای ریشه‌زایی

Polygonatum verticillatum در گیاه 2.4-D + 1 mg/l TDZ مشاهده شد.

بنا به نظر Khodashenas و همکاران (2016) دلیل واکنش کم به پینه‌زایی در گیاه *Polygonatum verticillatum* مقدار کم اکسین بوده است. در بافت داخلی برخی از گیاهان مقدار اکسین بسیار پایین است و احتمالاً به همین دلیل، برخی از گیاهان به مقادیر بسیار بالاتری از تنظیم‌کننده رشد اکسین برای تشکیل القای پینه نیاز دارند. نتایج بررسی Razavi و همکاران (2002) بر روی گیاه مرتعی *Aeluropus* نشان داد که بیشترین فراوانی تشکیل پینه در ترکیب هورمونی با مقادیر ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اکسین و سیتوکینین (BAP) به دست آمد. در بررسی بر روی گیاه *Cereus repandus* بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشدی برای تولید پینه 0.05 mg/l NAA + 0.07 mg/l TDZ بود (Karimi et al., 2010). معمولاً در بیشتر گیاهان تنظیم‌کننده رشد اکسین سبب تحریک القای پینه‌زایی و فاصله زمانی کمتر القای پینه می‌شود (Liu et al., 1993).

پژوهشگران دریافتند که گیاه آنتوریوم در محیط ۱/۲ MS با استفاده از ریزنمونه برگ بیشترین درصد جنین‌زایی را دارد (Satyan and Aswath, 2018). Wei و همکاران (2017) با بررسی بر روی درخت صنوبر کالیفرنایی (*Populus tomentosa*) نشان دادند که بالاترین باززایی ریزنمونه دم‌برگ در محیط کشت MS ۱/۲ با ترکیب تیمار تنظیم‌کننده رشد 0.25 mg/l BA + 0.25 mg/l TZ + 0.5 mg/l KIN + 0.25 mg/l NAA + 0.01 mg/l TDZ به دست می‌آید. بر اساس بررسی (Jamar and Krens, 1989) بر روی گیاه L-Beta *vulgaris*، از بین دو محیط کشت MS ۱/۲ و PGo ریزنمونه دم‌برگ در محیط MS ۱/۲ بالاترین باززایی را داشت.

پژوهشی در محیط WPM ۱/۲ همراه با ۳ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین درصد ریشه‌زایی مشاهده شد (Minghao et al., 2011). در بررسی دیگری بر روی درخت *Paulownia tomentosa* که با استفاده از محیط کشت MS ۱/۲ با ترکیب تنظیم‌کننده رشد NAA با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر درصد شاخسارهای ریشه‌دار به ۹۸ درصد رسید با غلظت ۲/۵ میلی گرم در لیتر NAA درصد ریشه‌زایی به ۸۰ رسید (Roy PK, 2015). Yi-xun و همکاران (2009) اظهار کردند که بالاترین درصد ریشه‌زایی در گیاه آنتوریوم (*A. andraeanum*) با ترکیب تیماری NAA (0.5 μmol L) در محیط MS ۱/۲ به دست آمد. براساس گزارش Roy و همکاران (2007) ریشه‌زایی گیاه *Averrhoa carambola* در محیط MS ۱/۲ در ترکیب تیمار تنظیم‌کننده رشد IAA و IBA با غلظت ۰/۲۵ میلی در لیتر درصد ریشه‌زایی به ۶۰ رسید در حالی که ۸۸ درصد ریشه‌زایی زمانی حاصل شد که ترکیب تیمار IAA و IBA با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که برای ریشه‌زایی در گیاه *Paulownia shangtong* در شرایط *In vitro* به مواد معدنی کمتری نیاز است. بر اساس گزارش Roy PK (2015)، بر روی درخت *Paulownia tomentosa* نشان دادند که طول ریشه با تنظیم‌کننده رشد NAA در سه غلظت ۰/۵، ۱/۵، ۲ انجام شد بیشترین طول ریشه در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر مشاهده شد و طول ریشه در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر به ۵ سانتی متر رسید. ریشه‌های که در اثر تنظیم‌کننده رشد NAA، علی‌الخصوص ریشه‌های که در غلظت بالا به وجود آمدند دارای کیفیت پایین‌تر و شکننده بودند. همچنین نتایج نشان داد ریشه‌های که در غلظت بالای تنظیم‌کننده رشد IBA به وجود آمده بودند کیفیت بهتری داشتند (Banilas and korkas, 2007). در پژوهشی بر روی

این پژوهش نشان داد در محیط کشت MS ۱/۲ و MS کامل با افزایش ترکیب تنظیم‌کننده رشد IBA (از یک میلی گرم در لیتر به ۱/۵ میلی گرم در لیتر) در محیط کشت IBA در محیط کشت، درصد و کیفیت ریشه‌زایی افزایش یافت. نتایج نشان داد با افزایش ترکیب تنظیم‌کننده رشد NAA درصد ریشه‌زایی کاهش یافت و ریشه‌های به دست آمده دارای کیفیت پایینی بودند. در پژوهشی که روی تکثیر ریشه‌زایی درون-شیشه‌ای گیاه *Spilanthes acmella* با استفاده از محیط کشت MS ۱/۲ با ترکیب تیمار تنظیم‌کننده رشد IBA و NAA و هر کدام در چهار سطح ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ انجام شد، پس از گذشت ۱۵ روز بالاترین درصد ریشه‌زایی در ترکیب تنظیم‌کننده رشد IBA با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر مشاهده شد و ریشه‌هایی که به دست آمده نسبت به ترکیب تنظیم‌کننده رشد NAA، طول‌تر، سالم‌تر و کیفیت بهتری داشتند (Yadav and singh, 2010). Ipekci و همکاران (2001) نشان دادند که در گیاه *Paulownia elongata* بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت WPM همراه تنظیم‌کننده رشد IBA با غلظت یک میلی گرم در لیتر اتفاق می‌افتاد. همچنین در بررسی دیگر Chunchukov و همکاران (2015) گزارش کردند موفقیت‌آمیزترین ریشه‌زایی درون شیشه‌ای، هنگامی به دست می‌آید که گیاهان در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی IBA (۰/۱ میلی گرم بر لیتر) قرار گیرد. Benmahiou و همکاران (2009) نشان دادند که شاخسارهای *Pistacia vera* بر روی محیط MS کامل همراه با ترکیب هومونی ۱۲/۳ میکرومولار IBA، ریشه‌دار شدند. در بررسی این‌ویترو و ژبرها مشخص شد که محیط ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد ریشه را داشته و محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده و محیط کشت حاوی یک میلی گرم در لیتر NAA کم‌ترین تعداد ریشه را داشت (Vernosefadrani et al., 2009). در

غلظت بالای تنظیم کننده رشد NAA (از ۱/۵ به ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) تعداد ریشه (از ۱۰-۱۲ به ۸-۶) کاهش پیدا کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش از حمایت معاونت پژوهشی و پارک علم و فناوری دانشگاه تهران در قالب طرح رویش (۱۲۰۰۲۱) برخوردار بود و نویسندگان از حمایت‌های آنان تشکر می‌نمایند.

References

- Arikat, N.A., F.M. Jawad, N.S. Karam & R.A. Shibli, 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wildstage (*Salvia fruticosa* Mill). *Science Horticulturae*, 100(1-4): 193-202.
- Ayan, S. & N. Bilir, 2006. Growth variation of *Paulownia* Sieb. and Zucc. species and origins at the nursery stage in Kastamonu-Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 27(3): 499-504.
- Bahmankar, M., S.M.M. Mortazavian, M. Tohidfar, S.A. Sadat Noori, A. Izadi Darbandi, G. Corrado & R. Rao, 2017. Chemical compositions, somatic embryogenesis, and somaclonal variation in cumin. *BioMed Research International*, 12: 489-503.
- Bahri, B.N. & T. Bettaieb, 2013. *In vitro* propagation of a forest tree *Paulownia tomentosa* (Thunb.) steud a valuable medicinal tree species. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 12(1): 37-42.
- Banilas, G. & E. Korkas, 2007. Rapid micropropagation of grapevine cv. Agiorgitiko through lateral bud development. *Journal of Science and Technology*, 42: 31-38.
- Benmahiou, B., M. Kaid-Harche, N. Dorion & F. Daguin, 2009. *In vitro* embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae*, 122(3): 479-483.
- Bergmann, B.A. & R. Whetten, 1998. *In vitro* rooting and early greenhouse growth of micropropagated *Paulownia elongate*. *New Forests*, 15(2): 127-138.
- Bergmann, B.A. & H. Moon, 1997. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. *Plant Cell Reports*, 16(5): 315-319.
- Bhavana, G.P., K.B. Satyan & C. Aswath, 2018. A regenerative protocol and SEM study for *In vitro* propagation of Anthurium crossed lines via indirect somatic embryogenesis. *Bioscience Biotechnology research communications*, 11(1): 31-40.
- Castillo-Martínez, C.R., M. Gutiérrez-Espinosa, M.T. Buenrostro-Nava, V.M. Cetina Alcalá & J. Cadena Iñiguez, 2012. Regeneración de plantas de *Paulownia elongata* Steud: Por organogénesis directa. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(10): 41-49.
- Chang, C.C., M.H. Yang, H.M. Wen & J.C. Chern, 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178-182.
- Chunchukov, A. & S. Yancheva, 2015. Micropropagation of *Paulownia* Species and Hybrids. In: *First National Conference of Biotechnology, Sofia* pp. 223-230.
- Clapa, D., A. Fira, M. Simu, L. Balcu-vasu & D. Buduroi, 2014. Improved *in vitro* propagation of *Paulownia elongata*, *P. fortunei* and its interspecific hybrid *P. elongata* x *P. fortunei*. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture Press, 422-427 p.
- Dadvar, F., T. Rostami, M.H. Assare, M. Emam & A. Shirvany, 2013. Effects of different concentrations of plant regulators on *In vitro* micropagation of *Celtis caucasica*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests*

گیاه *Salvia fruticosa* Mill افزایش تعداد ریشه در ترکیب تنظیم کننده رشد IBA بیشتر از ترکیب تنظیم کننده رشد IAA و NAA بود (Arikat et al., 2004) همچنین بیشترین تعداد ریشه و طول ریشه (cm) در گیاه *Allamanda cathartica* L در محیط کشت ۱/۲ MS زمانی به دست آوردند که غلظت IBA از ۰/۱ میکرومولار به ۰/۵ میکرومولار افزایش یافت (Nisha and Mohammad, 2018). پژوهش‌های انجام شده توسط Roy PK (2015) نشان داد در محیط کشت ۱/۲ MS با

- Plant Breeding and Genetic Research*, 21: 13-23.
- Desai, C., R. Inghalihalli & R. Krishnamurthy, 2015. Micropropagation of Anthurium andraeanum-An important tool in floriculture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(3): 112-117.
 - Guo-qiang, F., Z. Xiao-qiao, Z. Cui-juan & B.I. Hui-tao, 2001. Callus induction from leaves of different paulownia species and its plantlet regeneration. *Journal of forestry Research*, 12(4):209-14.
 - Hassanabasi, N.A. & M.K. Alizadehhesari, 1998. Properties and uses of wood for aircraft *Paulownia*, Glaydrv Havrgraft. In: Second National Conference on Aerospace Engineering, Esfahan, 12-14: 823- 827.
 - Hussain, A., I.A. Qarshi, H. Nazir, I. Ullah, M. Rashid & Z.K. Shinwari, 2013. *In vitro* callogenesis and organogenesis in *Taxus wallichiana* ZUCC, The Himalayan Yew. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5): 1755-1759.
 - Ipekci, Z., A. Altinkut, K. Kazan, K. Bajrovic & N. Gozukirmizi, 2001. High frequency plant regeneration from nodal explants of *Paulownia elongata*. *Plant Biology*, 3(2): 113-115.
 - Jazirei, M.H., 2003. Zagros silvice. Tehran University press, 560 P (In Persian)
 - Jimenez, L., J. Rodri, L. Ferrer, A. Perez & V. Angulo, 2005. *Paulownia* una planta de ra'pido crecimiento como materia prima para la fabricacio'n de papel Afinidad, (62) 516:100-105.
 - Karimi, N., R. Naderi, M. Ebrahimi & M. Mofid, 2010. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill. by using tissue culture methods. *Journal of Medicinal Plants*, 2:38-45.
 - Khodashenas, M., B. Keramat & Y. Emamipoor, 2016. Efficient *In vitro* Regeneration System for Conservation of *Levisticum officinale*: A Rare Medicinal Plant. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 6 (5): 66-70.
 - Koli, S.P., D.A. Patil, A.G. Patil & N. Chandra, 2009. Evaluation of *In vitro* responses from different explants of *Averrhoa caramboia* L. *Journal of Cell and Tissue research*, 9 (2):1839.
 - Krens, F.A. & D. Jamar, 1989. The Role of Explant Source and Culture Conditions on Callus Induction and Shoot Regeneration in Sugarbeet *Beta vulgaris* L. *Journal of Plant Physiology*, 134: 651-655.
 - Liu, C.M., Z.H. Xu & N.H. Chua, 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell*, 5(6): 621-630.
 - Melhuish, J.H., C.E. Gentry & P.R. Beckjord, 1990. *Paulownia tomentosa* seedling growth at different levels of pH, nitrogen and phosphorus. *Journal of Environmental Horticulture*, 8: 205-207.
 - Minghao, L., H. Jinyan, A. Qian, Z. Pingping, T. Mingli & W. Lifang, 2011. Regeneration and Rapid *Paulownia* in China Cultivation and Guo-qiang, Fan, Peng hai-feng and Zhai Xiao-giao. Protein diversity of *Paulownia* plant leaves and clusters. *Journal of Forestry Research*, 12 (1):21-24
 - Rahman, M.A., F. Rahman & M. Rahmatullah, 2013. *In vitro* regeneration of *Paulownia tomentosa* Steud. plants through the induction of adventitious shoots in explants derived from selected mature trees, by studying the effect of different plant growth regulators. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 7 (4): 259-268.
 - Razavi, K.H., M.A. Malbobi, S. Farahi Ashtiyani, F. Ghanati & S. Mohsenzadeh, 2002. Investigation of different methods on propagation of two rangelands variety of *Aeluropus* in controlled condition. *Iranian Journal of Biology*, 18:60-68.
 - Roy, P.K. 2015. *In vitro* plant regeneration of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. from shoot tip and leaf segment. *Bangladesh Journal of Botany*, 44:459-63.
 - Roy, P.K., A.N.K. Mamun & G. Ahmed, 2007. Rapid multiplication of *Averrhoa carambola* through *In vitro* culture. *Journal of Biological Sciences*, 15: 175-179.
 - San Jose, M., M. Cernadas & E. Corredoira, 2014. Histology of the regeneration of *Paulownia tomentosa* (Paulowniaceae) by organogenesis. *Revista de biologia tropical*. 62: 809-818.
 - Si, C.L., S.C. Liu, H.Y. Hu, J.Z. Jiang, G.J. Yu, X.D. Ren & G.H. Xu, 2013. Activity Guided Screening of the Antioxidants from *Paulownia tomentosa* var. *tomentosa* Bark. *Bioresources*, 8: 628-637.
 - Si, C.L., Y.Y. Lu & H.Y. Hu. 2011 Evaluation of total phenolics, flavonoids and anti-inflammatory property of ethanolic extracts

- of *Paulownia tomentosa* var. *tomentosa* bark. *Planta Medica* 77(12): SL53.
- Swamy, S.L., A. Mishra & S. Puri, 2006. Comparison of growth biomass and nutrient distribution in five promising clones of *Populus deltoides* under an agrisilviculture system. *Bioresource Technology*, 97: 57-68.
 - Tang, R.C., S.B. Carpenter, R.F. Wittwer & D.H. Graves, 1980. *Paulownia*: a crop tree for wood products and reclamation of surface-mined land. *Southern Journal of Applied Forestry*, 4:19-24.
 - Tawfik, G.A. & A. Noga, 2002. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69:35-40.
 - Tilkat, E., A. Onay & Y. Ozden Tokatli, 2009. *In vitro* rooting improvement of adult pistachio, *pistachia vera* L. atli. *Acta Horticulturae*, 839:215-222.
 - Tiwari, T. & P. Chaturvedi, 2018. Callus induction in *Polygonatum verticillatum* L. All.: An Astavarga medicinal herb. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7:2671-2674.
 - Vernosefadrani, M.T., N.A. Rabori & S.Z. Nosrati, 2009. *In vitro* optimization of *Gerbera*. *Journal of Seed and Plant*, 2(4):389-401.
 - Wang, Q. & J. Shogren, 1992. Characteristics of crop- *Paulownia* system in China Agric. Ecosys. Environ, 39: 145-152.
 - Wei, F., F.F. Zhao & B.M. Tian, 2017. *In vitro* regeneration of *Populus tomentosa* from petioles. *Journal of forestry research*, 28(3):465-71.
 - Zhu, Z.H., Chao, C.J., Lu, X.Y., & Y. G. Xiong, 1986. *Paulownia* in China: Cultivation and utilization. Singapore and International Development Research Center. *Asian Network of Biological Sciences*, 65 p.

The Study of effective factors in callus induction, somatic vegetative and regeneration in *Paulownia ShanTong*

Y.Dumani¹, S. M. M. Mortazavian^{*2}, A. Izadi Darbandi³, H.Ramshini⁴ and M. Bahmankar⁵

1- M.Sc. Student of Genetics & Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran. (yassin.dumani@ut.ac.ir)

2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran. (mortazavian@ut.ac.ir)

3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran. (aizady@ut.ac.ir)

4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran. (ramshini_h@ut.ac.ir)

5- Ph.D., Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran,

I. R. Iran. (bahmankar_64@alumni.ut.ac.ir)

Received: 09.04.2019

Accepted: 04.06.2019

Abstract

The present study was carried out to investigate callus induction, vegetative embryogenesis and indirect regeneration of *Paulownia shangtong*. This experiment was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design with five replications. The studied factors were explants and different compositions of the Murashik-Skogh medium. The interaction effect of explant and medium was significant for callus production rate, callus production percentage, callus area and vegetative embryogenesis percentage. The results of the mean comparison showed that the highest regeneration rate of vegetative embryos was obtained with petiole explant and medium of $\frac{1}{2}MS + 0.3 \text{ mg/l} + 2 \text{ mg/l KIN} + 4 \text{ mg/l BAP} + 0.30 \text{ mg/l}$. To test the root induction of regenerated seedlings a factorial experiment was conducted based on a randomized complete block design with five replications. The factors were different mediums (MS medium and $\frac{1}{2}MS$ medium) in combination with hormones of IBA, NAA and IAA. The highest percentage of rooting was observed in $\frac{1}{2}MS$ supplemented with 1.5 mg / l IBA. The regeneration of vegetative embryos in MS base medium was less than other mediums.

Keywords: Callus induction, Explant, Medium, Rooting.

* Corresponding author

Tel: +989126788738