Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 1, Spring 2020 (153-164)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.252548.1401

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۹ (ص ۱۶۴-۱۵۳)

بهینه‌سازی ازدیاد درون‌شیشه‌ای گل صد تومانی (*Paeonia mascula* Mill (L.))

ادریس مهدوی فکیجور[۱]، هدایت زکی‌زاده[۲*]، ولی الله مظفریان[۳] و حسن رضادوست چهارده[٤]

۱. دانشجوی دکتری مهندسی علوم باغبانی (گیاهان زینتی)، گروه علوم باغبانی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت

۲. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۳. استاد، سازمان جنگل‌ها و مراتع کشور، گیاه‌شناس سیستماتیک گیاهی، باغ ملی گیاه‌شناسی پیکان‌شهر، تهران

٤. استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۰)

چکیده

این پژوهش در دو مرحله جهت بهینه‌سازی تکثیر درون‌شیشه‌ای گل صدتومانی بومی ایران انجام شد. در مرحله اول اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آمینوپیورین (BAP) (صفر، ۰/۵، و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، نفتالن استیک اسید (NAA) (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) و جیبرلیک اسید (GA3) (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) روی جوانه‌های انتهایی گل صد تومانی گونه *mascula* به‌منظور باززایی مورد مطالعه قرار گرفت و در مرحله دوم اثر غلظت‌های مختلف BAP (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) روی القای کالوس‌های جنینی از برگ‌های جوان بررسی شد. در تمام آزمایش‌ها محیط کشت پایه MS مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله اول بیشترین تعداد شاخه (۵/۳۸) در یک میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به‌دست آمد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت BAP باعث کاهش طول شاخساره شد. حداکثر فراوانی کالوس جنین‌زای متراکم (۱۷/۹۳) و تعداد جنین سوماتیکی در هر ریزنمونه (۷/۱۱) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. حداکثر درصد ریشه‌زایی (۷۰/۵۱ درصد) و تعداد ریشه (۵/۰۲) با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: اندام‌زایی، جنین‌زایی سوماتیکی، کشت درون‌شیشه‌ای.

Optimization in vitro micropropagation of peony (*Paeonia mascula*)

Edris Mahdavi Fikijvar[1], Hedayat Zakizadeh[2*], Valiollah Mozaffarian[3] and Hassan Rezadoost[4]

1. Ph.D. Candidate, Department of Horticultural Sciences, University Campus, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran

(Received: Mar. 1, 2018 - Accepted: Feb. 9, 2019)

ABSTRACT

This research was conducted in two stages to optimize *in vitro* propagation of Persian wild paeony. Stage 1: effect of BAP (0, 0.5, 1 and 2 $mg.l^{-1}$), NAA (0, 0.1, 0.2 and 0.3 $mg.l^{-1}$) and GA_3 (0 and 0.5 $mg.l^{-1}$) on apical bud of *Paeonia mascula* and stage 2: effect of BAP (0, 0.5, 1 and 2 $mg.l^{-1}$) and NAA (0, 0.25, 0.5 and 1 $mg.l^{-1}$) were studied on embryonic callus induction on young leaves of *Paonia mascula*. At stage 1: the highest shoots number (5.38) was obtained on media containing 1 $mg.l^{-1}$ BAP + 0.1 $mg.l^{-1}$ NAA+ 0.5 $mg.l^{-1}$ GA_3. The results showed that increasing BAP level caused decreasing of shoot length. At stage 2: maximum of compact embryonic callus (17.93%) and somatic embryo number per explant (7.11) were obtained on 2 $mg.l^{-1}$ BAP and 0.5$mg.l^{-1}$ NAA. For callus proliferation, calli were maintained on MS medium containing 2 $mg.l^{-1}$ BAP, 0.1 $mg.l^{-1}$ NAA and 0.5 $mg.l^{-1}$ GA_3. Maximum rooting percentage (70.51%) and root number (0.0.02) were obtained with 0.25 $mg.l^{-1}$ NAA.

Keywords: *In vitro* culture, organogenesis, somatic embryogenesis.

* Corresponding author E-mail: Zakizadeh@guilan.ac.ir; Zakizadeh55@yahoo.com

مقدمه

گونه‌های مختلف گل صدتومانی متعلق به تیره صدتومانی (Paeoniaceace) است و از حدود دو هزار سال پیش به‌عنوان یک گیاه زینتی و دارویی با ارزش کشت و کار شده است. از جمله فواید دارویی گل صد تومانی می‌توان به فعالیت‌های بیولوژیکی شامل خواص ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی، تقویت سیستم ایمنی بدن و قلب و فعالیت‌های مرکزی سیستم عصبی اشاره کرد (Tian *et al*., 2010). *Paeonia mascula* یک گونه بومی از صدتومانی های علفی و چندساله و بومی غرب کشور (کردستان) می‌باشد (Maroofi, 2005). این گونه یک گیاه پراهمیت از نظر ژنتیکی جهت پیش‌برد برنامه‌های اصلاحی با ارزش تجاری بالا می‌باشد. بیشتر گونه‌های آسیایی-اروپایی صدتومانی در زیستگاه‌های خود به سبب از بین رفتن رویشگاه ها و برداشت غیر مجاز آنها به شدت مورد تهدید قرار گرفته اند (Page, 2005).

گل‌های صدتومانی علفی به‌طور معمول از طریق تقسیم ریشه‌های غده‌ای حاوی ۳-۵ جوانه رویشی در حال خواب تکثیر می‌شوند (Qin, 2004). همچنین به دلیل وجود خواب فیزیولوژیکی در بذرها، جوانه‌زنی در آنها بسیار پایین و ضعیف می‌باشد. تکثیر این گونه‌ها از طریق کشت بافت، سرعت و میزان تکثیر این گیاه را افزایش می‌دهد و همچنین دوره‌های اصلاحی این گیاه را جهت معرفی ارقام جدید از کلون های انتخاب شده کوتاه می سازد (Yu *et al*., 2012). چندین مطالعه کشت بافت از طریق باززایی شاخه به‌صورت مستقیم و غیر مستقیم در این گونه توسط برخی محققین گزارش شده است (Wang *et al*., 2010, 2012; Yu *et al*., 2011; Hosoki *et al*., 1989; Tian *et al*., 2010).

اگرچه پیشرفت‌هایی در ریزازدیادی گونه‌های صدتومانی حاصل شده است، اما القای غیرمستقیم شاخه از طریق کالوس بسیار مشکل بوده و نیاز به زمان طولانی دارد و همچنین میزان قهوه‌ای‌شدن بیش از حد بافت‌ها مشکل عمده‌ای است که از باززایی شاخساره‌ها از کالوس جلوگیری می‌کند (Buchheim & Meyer, 1992; Radtke, 1983). با این وجود بیشتر مطالعات بر روی القای غیرمستقیم شاخه متمرکز شده است اما نتایج قابل توجه نمی‌باشند. در مطالعه‌ای که بر روی کشت گونه *P. lactiflora* انجام شده است، پس از کشت ریزنمونه‌های برگ، ساقه و دمبرگ، کالوس تشکیل شد ولی با واکشت کردن کالوس‌های تولیدشده هیچ شاخساره‌ای باززایی نشد (Zhang, 2006). همچنین در تحقیقی دیگر با کشت جوانه گل و قطعات ریشه، کالوس القا شد ولی هیچگونه باززایی مشاهده نشد (Meyer, 1976). گزارش‌های بسیار کمی در ارتباط با جنین‌زایی سوماتیکی در گل صد تومانی وجود دارد (Kim & Lee 1996; Kim *et al*., 2006; Lee *et al*., 1992). در گزارشی، کالوس‌های القاشده از جنین‌های استخراج شده از بذرها به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌دست آمده است و جنین سوماتیکی در آنها در محیط حاوی BAP (N6-Benzylaminopurine) و NAA(1-Naphthyleneacetic) تشکیل شد (Jin-Jing, 1987).

در گونه‌های صد تومانی باززایی شاخساره‌ها به‌صورت مستقیم بیشتر مورد توجه بوده و موفقیت‌هایی نیز در این زمینه صورت گرفته است (Hosoki *et al*., 1989; Gabryszewska, 1998; Bouza *et al*., 1994a, b; Kong & Zhang, 1998). در یک آزمایش انجام شده با کشت شاخساره‌های انتهایی پژوهش‌گران موفق به تولید جوانه‌های نابه‌جا در محیط کشت حاوی GA_3 (Gibberellic acid) و BAP شدند (Hosoki *et al*., 1989). در میان ریزنمونه‌های استفاده شده (جوانه‌های جانبی، شاخساره‌های انتهایی، گره‌های ساقه، دمبرگ‌ها و قسمت های برگ) که برای القای مستقیم شاخه مورد استفاده قرار می گیرد، تولید شاخساره‌های نابه‌جا در جوانه‌های جانبی و شاخساره‌های انتهایی از همه چشم‌گیرتر بوده است (Hosoki *et al*., 1989; Orlikowska *et al*., 1998; Guo, 2001; Tian *et al*., 2010; Yu *et al*., 2012). در بیشتر این گزارش‌ها استفاده از ترکیبات سیتوکینینی به‌ویژه بنزیل‌آدنین (6-benzyladenine) در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر بسیار مؤثر بوده است.

بنابراین، جهت دست‌یابی به یک دستورالعمل مناسب جهت ریزازدیادی گونه بومی گل صدتومانی، اثر BAP، NAA و GA_3 بر باززایی و رشد جوانه‌های

انتهایی گل صدتومانی گونه *Paonia mascula*، اثر NAA و BAP روی برگ‌های جوان این گونه به‌منظور القاء کالوس و نیز اثر NAA بر روی ریشه‌زایی شاخساره‌های باززایی شده مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مرحله اول آزمایش

شاخه‌های گل صد تومانی بومی (*Paeonia mascula*) به طول ۵-۳ سانتی‌متر همراه با جوانه‌های انتهایی رشد یافته از ریشه‌های غده‌ای در مرحله رویشی از ارتفاع ۱۴۵۰ متری در کوه‌های استان کردستان جمع‌آوری و جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. جهت ضدعفونی سطحی، شاخه‌های حاوی جوانه انتهایی در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه همراه با حرکت دورانی غوطه‌ور شدند، سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو و در سدیم هیپوکلریت ۱ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه غوطه ور و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل هر بار به‌مدت ۵ دقیقه شسُتشو شدند. جوانه‌های انتهایی (به طول ۱-۰/۸ سانتی‌متر) از شاخه‌های ضدعفونی شده جدا شدند. لایه های رویی جوانه (برگ‌های اولیه و ثانویه) حذف شدند و جوانه‌های انتهایی به‌عنوان ریزنمونه اصلی در شیشه‌های مربای ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی محیط کشت پایه Murashige & Skoog MS (1962) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و جیبرلیک اسید (GA_3) (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۳۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه با لامپ‌های فلورسنت)، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای هر تیمار ۸ تکرار در نظر گرفته شد و در هر ظرف کشت یک ریزنمونه کشت شد. در این پژوهش صفات تعداد هر شاخساره، تعداد شاخساره، تعداد برگ، طول شاخساره (از یقه گیاه تا بالاترین ارتفاع شاخه برحسب سانتی‌متر) و درصد باززایی (تعداد گیاهان باززایی‌شده برحسب کل ریزنمونه‌های کشت‌شده) ۴-۶ هفته بعد از کشت مورد ارزیابی قرار گرفت.

مرحله دوم آزمایش

در این پژوهش برگ‌های جوان و رشد یافته گل صد تومانی بومی به‌عنوان منبع ریز نمونه استفاده شد. ضدعفونی برگ‌ها با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و سدیم هیپوکلریت ۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل هر بار به‌مدت ۵ دقیقه آبکشی شدند. به‌منظور تهیه ریزنمونه، برگ‌های جوان به قطعاتی به طول ۱×۱ سانتی‌متر بریده شده و جهت القاء کالوس به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با NAA (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. در هر ظرف کشت (شیشه مربا) ۴-۵ ریزنمونه کشت شد. در طی القای کالوس، ریزنمونه‌ها تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باززایی کالوس‌های جنین‌زا و گیاهان تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. هر چهار هفته یکبار عمل واکشت ریزنمونه‌ها و انتقال به محیط کشت تازه صورت گرفت. در این پژوهش صفات درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس، درصد کالوس جنین‌زای متراکم و تعداد جنین در هر کالوس در محیط کشت ارزیابی شد. تشکیل کالوس چهار هفته بعد از کاشت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد استفاده شده بر وزن تر کالوس، به‌طور تصادفی از هر تکرار ۳ ریزنمونه که دارای کالوس بودند، انتخاب شد. جهت باززایی گیاهان از جنین‌های سوماتیکی، کالوس‌های جنین‌زای متراکم به محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید GA_3 انتقال داده شدند.

ریشه‌زایی و سازگاری

جهت تشکیل ریشه‌های نابه‌جا از شاخساره‌های تولیدشده در مراحل قبل، شاخساره‌های به طول ۳-۴

سانتی‌متر به‌صورت منفرد به محیط کشت MS حاوی صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و تحت شرایط ۱۵ روز تاریکی انتقال داده شدند. پس از گذشت ۱۲-۱۴ هفته از شروع آزمایش و واکشت‌ها، گیاهچه‌ها همراه با ریشه‌های توسعه یافته از محیط کشت جدا شدند و پس از شستشوی آگار از روی ریشه‌ها با آب استریل به داخل گلدانهای پلاستیکی حاوی پیت ماس و پرلیت استریل به نسبت ۲:۱ منتقل شدند. برای سازگاری، گلدان‌ها با پوشش های پلی اتیلنی با چند منفذ پوشانده و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای حفظ رطوبت، روزانه دو تا سه بار با آب اسپری شدند. پس از طی یک هفته، به تدریج منافذ موجود بیشتر و بزرگتر شدند. از هفته دوم به بعد، پوششهای پلاستیکی بتدریج برداشته شدند و در نهایت بعد از سازگاری، گیاهچه‌ها با موفقیت به گلخانه انتقال یافتند.

تجزیه آماری

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۸ تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) صورت گرفت. مقایسات میانگین داده‌ها در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

مرحله اول آزمایش

براساس نتایج ارائه‌شده در جدول ۱، در میان غلظت‌های مختلف BAP و NAA از نظر تأثیر بر تعداد جوانه و شاخساره تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد (جدول ۱). آغازش پریموردیای جوانه ۳-۴ هفته بعد از کشت بر روی سطح یا از قسمت‌های برش خورده جوانه‌های انتهایی در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 مشاهده شد (شکل c-۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین تعداد جوانه و شاخساره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بدون گذر از فاز کالوس با اندام‌زایی مستقیم به‌دست آمد. تحریک تشکیل جوانه نابه‌جا در محیط MS حاویBAP و GA3 پیش‌تر در گیاه صدتومانی گزارش شده است (Hosoki *et al.*, 1989).

جدول ۱. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف (GA_3)، (BAP) و (NAA) روی باززایی شاخساره در *Paeonia mascula*

Table 1. Effect of different levels of (GA_3), (BAP) and (NAA) on shoots regeneration in *Paeonia mascula*

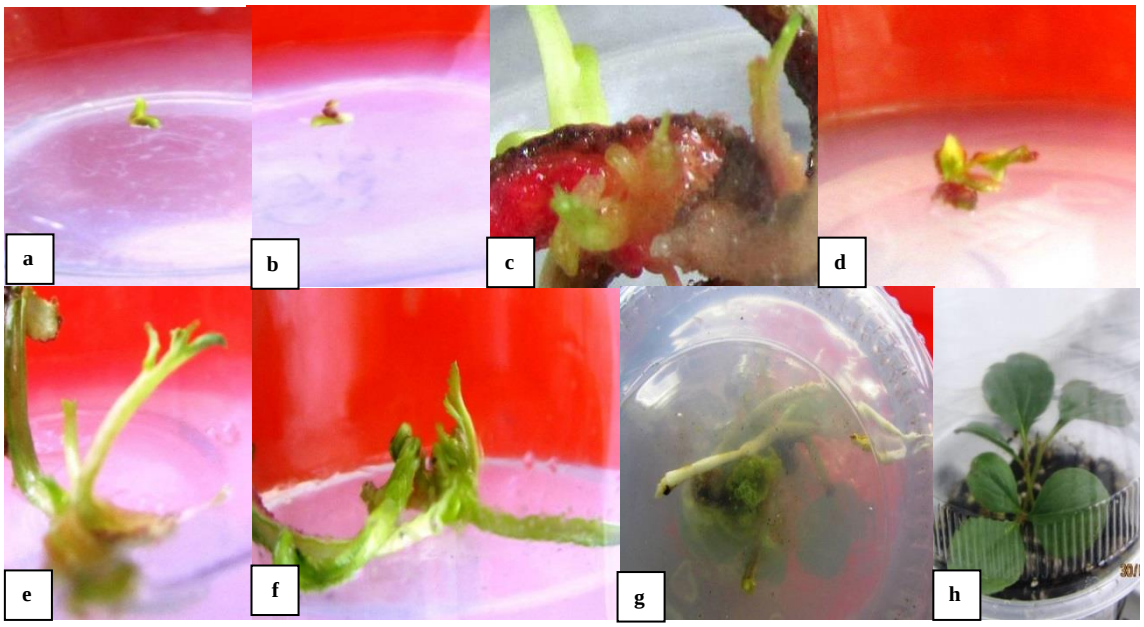
Regeneration (%)	Shoot Number	Buds Number	Shoot Length (cm)	Leaf Number	BAP	NAA	GA3
						($mg.l^{-1}$)	
0.95^{k}	0.50^{mn}	0.33^{mn}	0.79^{k}	1.66^{fg}	0	0	0
4.47^{k}	1.43^{k}	0.74^{kl}	1.59^{ij}	2.37^{cdef}	0	0	0.5
2.91^{k}	0.91^{i}	0.21^{mn}	1.1^{jk}	2.32^{def}	0	0.1	0
6.41^{k}	1.56^{k}	0.93^{jk}	2.35^{defgh}	2.36^{cdef}	0	0.1	0.5
2.26^{k}	0.58^{klmn}	0.19^{mn}	1.15^{jk}	1.45^{g}	0	0.2	0
4.17^{k}	0.77^{im}	0.43^{im}	2.12^{efghi}	1.31^{g}	0	0.2	0.5
0.00^{k}	0.00^{o}	0.00^{n}	0.00^{l}	0.00^{h}	0	0.3	0
0.57^{k}	0.27^{no}	0.16^{mn}	0.79^{k}	0.39^{h}	0	0.3	0.5
19.93^{ij}	2.00^{nij}	1.38^{ni}	2.56^{cdefg}	2.77^{cde}	0.5	0	0
24^{hi}	2.81^{e}	1.69^{defgh}	2.88^{bcd}	3.02^{bcd}	0.5	0	0.5
23.33^{hi}	2.28^{gh}	1.68^{efgh}	2.86^{bcd}	2.91^{bcd}	0.5	0.1	0
28.00^{fh}	2.68^{er}	1.85^{bcdef}	3.27^{b}	3.09^{bc}	0.5	0.1	0.5
18.33^{ij}	2.06^{hi}	1.56^{efgh}	2.44^{defgh}	2.54^{cde}	0.5	0.2	0
24.00^{hi}	2.44^{fg}	1.74^{cdefg}	2.71^{bcdef}	2.78^{cde}	0.5	0.2	0.5
13.00^{j}	1.67^{jk}	0.95^{jk}	1.86^{ni}	2.13^{er}	0.5	0.3	0
15.66^{j}	1.74^{ijk}	1.21^{ij}	2.05^{ghi}	2.36^{cdef}	0.5	0.3	0.5
35.33^{g}	2.98^{e}	1.7^{defgh}	2.88^{bcd}	2.99^{bcd}	1	0	0
44.33^{def}	3.65^{cd}	2.06^{bc}	3.17^{bc}	3.58^{b}	1	0	0.5
60.33^{b}	4.08^{b}	2.02^{bcd}	3.16^{bc}	3.11^{bc}	1	0.1	0
77.2^{a}	5.38^{a}	2.81^{a}	4.01^{a}	4.74^{a}	1	0.1	0.5
50.66^{cd}	3.8^{bcd}	1.81^{cdefg}	2.93^{bcd}	2.87^{bcde}	1	0.2	0
54.00^{c}	3.99^{bc}	2.01^{bcd}	3.13^{bc}	3.11^{bc}	1	0.2	0.5
43.66^{ef}	3.50^{d}	1.47^{ghi}	2.68^{bcdef}	2.76^{cde}	1	0.3	0
46.00^{def}	3.60^{d}	1.76^{cdefg}	2.87^{bcd}	2.87^{bcde}	1	0.3	0.5
24.33^{hi}	2.72^{er}	1.67^{defgh}	2.74^{bcde}	2.76^{cde}	2	0	0
27.00^{fh}	2.88^{e}	1.8 ^{cdefg}	2.91^{bcd}	2.83^{cde}	2	0	0.5
46.00^{def}	3.64^{cd}	1.92^{bcde}	2.56^{cdefg}	2.7^{cde}	2	0.1	0
49.66^{cde}	3.82^{bcd}	2.17^{b}	2.74^{bcde}	2.78^{cde}	2	0.1	0.5
40.67^{fg}	3.54^{d}	1.84^{bcdef}	2.42^{defgh}	2.41^{cde}	2	0.2	0
43.66^{ef}	3.70^{cd}	1.98^{bcd}	2.57^{cdefg}	2.6^{cde}	2	0.2	0.5
29.33^{fh}	2.93^{e}	1.47^{ghi}	2.09^{fghi}	2.13^{er}	2	0.3	0
28.00^{fh}	3.05^{e}	1.55^{fgh}	2.34^{defgh}	2.33^{def}	2	0.3	0.5

* میانگین‌های دارای حروف مشترک درهر ستون براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

* Means in a column having same letter are not significantly different at the 5% level as determined by Duncan's.

افزایش بیشتر در غلظت BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش طول و تعداد شاخساره شد. نتایج مشابهی توسط دیگر پژوهش‌گران با ریزنمونه‌های گرفته‌شده از شاخه‌های انتهایی و جوانه‌های محوری صدتومانی گزارش شده است (Zhang *et al*., 2001; Chen, 2005). با توجه به نتایج این پژوهش و گزارش‌های سایر پژوهش‌گران، BAPنقش عمده‌ای در باززایی و القای تشکیل جوانه‌ها و شاخساره‌های نابه‌جا در صدتومانی دارد (Zhang *et al*., 2001; Li 2004; Wang *et al*. 2012). همچنین اثر ترکیب BAP و GA_3 در بهبود کارایی باززایی در صد تومانی توسط سایر پژوهش‌گران گزارش شده است (Kong & Zhang, 1998).

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف IAA، BAP و GA3 بر ظرفیت القای جوانه‌های نابه‌جا در ارقام مختلف صدتومانی گونه *P. suffruticosa* گزارش شده است (Wang, 2007). سیتوکینین‌ها به‌منظور تحریک سلول‌های گیاهی به خوبی شناخته شده اند. بر طبق نتایج به‌دست‌آمده توسط سایر پژوهش‌گران، BAP بیشترین کارایی در پرآوری گل صد تومانی را دارد (Gabryszewska, 1998; Bouza *et al*., 1994a; Hosoki *et al*., 1989). علاوه بر این، در مطالعه‌ای که در گونه *Paeonia suffruticosa* صورت گرفته است، گزارش شده است که BAP تنها سیتوکینین مؤثر برای رشد جوانه‌های محوری برگ بود و وقتی با دیگر سیتوکینین‌ها ترکیب شد کارایی آن کاهش یافت (Bouza *et al*., 1994a). برخی از پژوهش‌گران اثرات مفید سیتوکنین‌ها بر القای جوانه‌های نابه‌جا در صدتومانی های علفی را گزارش کرده اند (Hosoki *et al*., 1989; Albers & Kunneman 1992; Tian, 2008).



شکل ۱. القای شاخه و پرآوری در صدتومانی (*Paeonia mascula*)، (a و b) ریزنمونه‌های جوانه انتهایی بترتیب ۳ و ۷ روز بعد از کشت، (c) القای جوانه‌ها و آغازش شاخساره ۳-۴ هفته بعد از کشت بر روی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3، (d) رشد و نمو جوانه‌ها و شاخساره‌های نابه‌جا، (e و f) پرآوری شاخساره‌ها ۷-۸ هفته بعد از کشت بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3، (g) تشکیل ریشه ۱۲-۱۴ هفته بعد از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت MS همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، (h) مقاوم سازی گیاهچه های ریشه‌دار شده.

Figure 1. Shoot induction and multiplication in *Paeonia mascula*, (a and b) Shoot tips explants 3 and 7 day after culture, respectively, (c) Induction of buds and shoot primordia 3-4 weeks after culturing on the MS (Murashige and Skoog, 1962) medium containing 1 $mg.l^{-1}$ BAP, 0.1 $mg.l^{-1}$ NAA and 0.5 $mg.l^{-1}$ GA_3, (d) Growth and development of buds and adventitious shoots, (e and f) Shoots proliferation 7-8 weeks after incubation on MS medium supplemented with 1 $mg.l^{-1}$ BAP, 0.1 $mg.l^{-1}$ NAA and 0.5 $mg.l^{-1}$ GA_3, (g) Root formation after 12-14 weeks of incubation of explants on MS medium supplemented with 0.25 $mg.l^{-1}$ NAA, (h) Hardening of rooted plantlets.

گزارش شده است که که کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین تأثیر مثبت بر باززایی صدتومانی علفی (*P. lactiflora*) را دارد (Wu *et al*., 2011).

نتایج نشان داد که افزودن بیشتر در غلظت اکسین (۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA) به محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP باعث کاهش تعداد شاخساره‌های باززایی شده از جوانه‌های انتهایی شد. این یافته با نتایج گزارش‌های سایر پژوهش‌گران در گونه *P. lactiflora* Pall مشابهت دارد (Zhang, 2006; Rather *et al*. 2014).

حضور GA_3 به تنهایی در محیط کشت، به میزان بسیار اندکی منجر به القای جوانه‌های نابه‌جا و بالارفتن درصد باززایی شد (جدول ۱). اما ترکیبی از BAP با GA_3، میزان القای جوانه‌ها و پرآوری را در مقایسه با BAP به تنهایی افزایش داد (جدول ۱). رشد شاخساره‌های محوری با توجه به طول ساقه و تعداد برگ اندازه‌گیری شد. حداکثر طول ساقه (۴/۰۱ سانتی‌متر) و تعداد برگ (۴/۷۴) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 ثبت شد (جدول ۱). بر اساس داده‌های آماری و مشاهدات، افزایش بیشتر در غلظت BAP طول ساقه و تعداد برگ را کاهش داد. بنابراین افزایش بیشتر در غلظت BAP باعث کاهش طول شاخه می‌شود (Bouza *et al*., 1994a, b).

این نتایج با یافته‌های قبلی در گونه *P. suffruticosa* مشابهت دارد (Bouza *et al*., 1994b). القای جوانه در صدتومانی پیش‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است (Fan & Fan, 2005). آنها نشان دادند که بهترین محیط برای القای جوانه برای *P. rockii* در محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3 حاصل شده است. بنابراین تیمار خارجی با جیبرلین می‌تواند باعث رشد شاخساره نابه‌جا در حضور سیتوکنین‌ها شود (Gabryszewska, 2010). جیبرلین‌ها باعث افزایش طول عمر سلولی توسط القای آنزیم‌هایی از قبیل گزیلوگلوکان اندوترانس گلیکوسیلاز (XET)، اکسپنسین و پکتیک متیل‌استراز (PME) که در دیواره سلولی و بلافاصله گسترش یافته‌اند، می‌شوند (Rahman *et al*., 2004). سیتوکینین‌ها باعث افزایش تقسیم سلولی و غلبه بر غالبیت انتهایی شده و بنابراین باعث انشعاب جوانه‌های محوری می‌شوند. با توجه به این اثر فیزیولوژیکی سیتوکینین‌ها، به‌منظور پرآوری در شرایط درون‌شیشه ای، تنظیم‌کننده‌های رشد این گروه در مقادیر بالاتری از دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد نیاز هستند (Nasri *et al*., 2013; Bouza *et al*., 1994b). جیبرلین‌ها باعث تحریک باززایی جوانه‌های نابه‌جا و همچنین با افزایش طویل شدن سلول‌ها منجر به افزایش در طول شاخساره‌ها می‌شوند (Krikorian *et al*., 1987). اکسین‌ها مسئول تمایز سلولی هستند و رشد را با تقسیم سلولی و طویل‌شدن سلولی افزایش می دهند (Krikorian *et al*., 1987; Kartha *et al*., 1974). از این‌رو، ترکیب این هورمون‌ها با یکدیگر میزان پرآوری شاخساره‌ها را افزایش می‌دهد و همچنین طویل‌شدن شاخه در گونه‌های مختلف در شرایط کشت بافت را افزایش می‌دهد.

مرحله دوم آزمایش

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که تشکیل کالوس جنین‌زا تحت تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و NAA قرار گرفت. با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول ۲، بیشترین درصد تولید کالوس (۷۸/۰۱ درصد) بر روی محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده توسط Xie (1987) مطابقت دارد. در پژوهشی با کاربرد BA و NAA، هنگامی‌که به‌صورت ترکیبی مورد استفاده قرار گرفته است، بیشترین اثر را در القای کالوس در گونه *P. suffruticosa* را داشت (Shi & Zhang, 2005).

تشکیل کالوس چهار هفته بعد از کشت بر روی محیط کشت القای کالوس از محل‌های برش‌خورده ریزنمونه‌های برگ پدیدار شد (شکل ۲-a). در این آزمایش دو نوع کالوس شامل کالوس‌های جنین‌زای متراکم و کالوس‌های سست یا غیرجنینی (شکل ۲-a, b) مشاهده شد. کالوس‌های غیر جنینی در نهایت نکروزه شده و از بین رفتند و به‌طور معمول توانایی نمو

به جنین سوماتیکی را ندارد (Karami, 2008). کالوس‌های سست دارای رنگ سفید تا زرد با شکل کروی و رشد سریع بودند و به آسانی به واحدهای مجزا تقسیم می‌شدند. کالوس‌های جنین‌زای متراکم ابتدا دارای رنگی سفید بودند و سپس به زرد تغییر رنگ پیدا کرده و همچنین دارای رشدی کندتر بوده و به سختی به واحدهای مجزا تقسیم می‌شدند (شکل c-۲).

افزودن BAP به NAA به‌خوبی توانست تشکیل کالوس جنین‌زای سست و متراکم را افزایش دهد. اثر BAP یا دیگر ترکیبات سایتوکینینی روی جنین‌زایی به قابلیت BAP جهت تحریک تولید داخلی هورمون‌های طبیعی شبیه زآتین (Zeatin) نسبت داده شده است (Zaerr & Mapes, 1982).

بیشترین درصد کالوس‌های جنین‌زای متراکم (۱۷/۹۳٪) در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (جدول ۲). استفاده از سایتوکینین در ترکیب با اکسین در القا و باززایی جنین‌های رویشی (Somatic embryos) در کشت کالوس بعضی از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Mol & Von Arnold, 1991; Karmai, 2008; Grando *et al.*, 2002; Bhaskaran & Smith, 1990) در این مطالعه افزودن غلظت پایین NAA (۰/۵-۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) به محیط کشت حاوی BAP به‌طور معنی‌داری تعداد و درصد جنین‌های نمو یافته از کالوس‌های جنین‌زا پس از گذر از مراحل مختلف جنینی با تشکیل جنین کروی، لپه، رشد آغازه شاخه و پرآوری شاخه‌ها به گیاهچه از ریزنمونه‌ها را افزایش داد (شکل c-f-۲).

برای کاربرد بیوتکنولوژی جهت برنامه‌های اصلاحی صدتومانی، کارایی بالاتر باززایی گیاه برای تعداد بیشتری از گونه‌های این گیاه ضروری است. پروتکل باززایی تشریح شده در این مطالعه می‌تواند به آسانی در تغییر ژنتیکی گیاه یا تراریخته‌کردن صدتومانی مورد استفاده قرار گیرد.

هنگامی‌که ریزنمونه‌ها روی محیط کشت با ترکیب BAP و NAA کشت شدند، پس از ۵۰-۴۵ روز، جنین‌های سوماتیکی مشاهده شد. برای القای جنین‌زایی سوماتیکی، تعادل اکسین و سیتوکنین مهم است و BAP یکی از سیتوکنین‌ها است که معمولاً در ترکیب با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌طور مشابه، القا و بلوغ جنین‌های سوماتیکی در محیط MS حاوی BA و NAA در *Digitalis lamarckii* (Verma *et al.*, 2011)، *P. albiflora* (Kim & Lee 1996)، *Psoralea corylifolia* (Sahrawat & Chand 2001)، *Arabidopsis thaliana* (Gaj, 2004) و *Crocus sativus* (Rajabpoor *et al.*, 2007) مشاهده شده است.

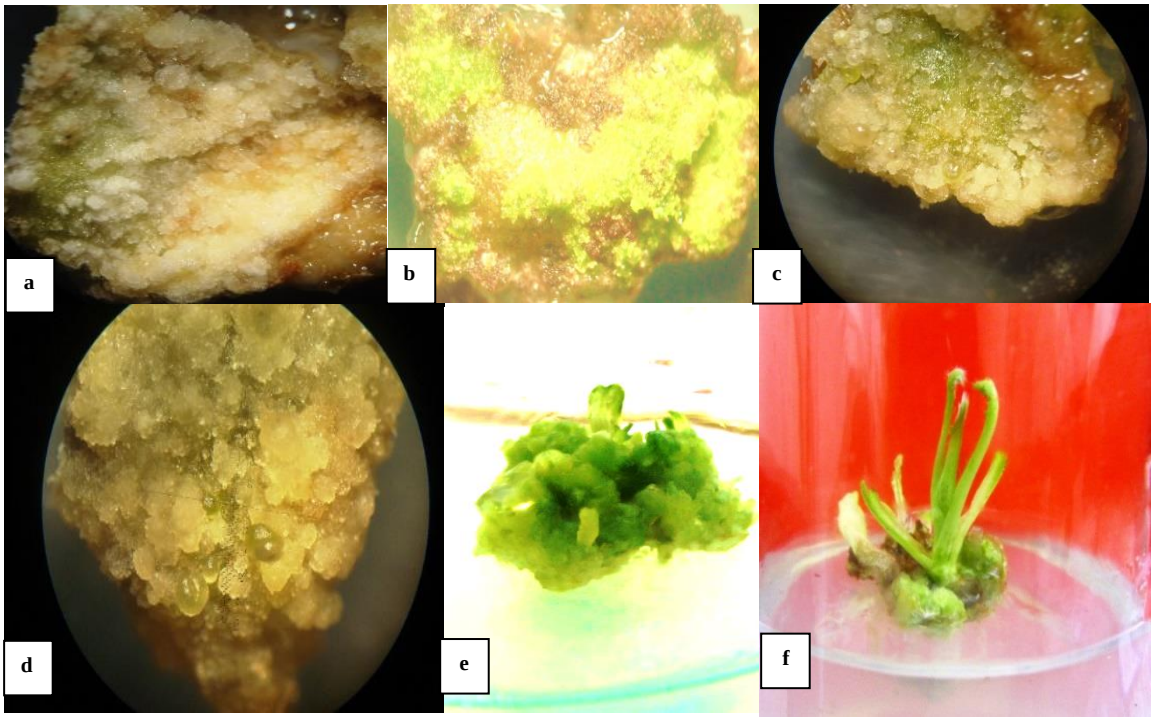
جدول ۲. مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف (BAP) و (NAA) روی القای کالوس جنینی در *Paeonia mascula*

Table 2. Effect of different levels of (BAP) and (NAA) on embryogenic callus induction some of measured parameters in *Paeonia mascula*

Embryo Number	Compacted Embryogenic Callus (%)	Callus weight	Callus induction (%)	NAA	BAP
				($mg.l^{-1}$)	
0.00^{g}	0.00^{h}	0.00^{i}	0.00^{i}	0	0
0.00^{g}	0.00^{h}	0.21^{h}	20.67^{h}	0.25	0
1.04^{f}	1.33^{g}	0.31^{fg}	49.00^{f}	0.5	0
1.14^{f}	1.35^{g}	0.27^{g}	44.00^{g}	1	0
0.00^{g}	0.00^{h}	0.00^{i}	0.00^{i}	0	0.5
2.02^{e}	4.00^{f}	0.34^{ef}	56.67^{de}	0.25	0.5
2.68^{cde}	6.00^{e}	0.28^{g}	62.67^{bc}	0.5	0.5
2.50^{de}	5.33^{e}	0.25^{gh}	$53.33^{ef\backslash\backslash}$	1	0.5
0.00^{g}	0.00^{h}	0.00^{i}	0.00^{i}	0	1
3.03^{cd}	7.33^{d}	0.38^{e}	59.33^{cd}	0.25	1
5.27^{b}	9.33^{c}	0.44^{d}	65.67^{b}	0.5	1
2.79^{cde}	7.66^{d}	0.38^{e}	55.00^{de}	1	1
0.00^{g}	0.00^{h}	0.00^{i}	0.00^{i}	0	2
4.66^{b}	10^{bc}	0.59^{b}	61.67^{bc}	0.25	2
7.11^{a}	17.93^{a}	0.69^{a}	78.01^{a}	0.5	2
5.00^{b}	11.00^{b}	0.49^{c}	56.00^{de}	1	2

* میانگین‌های دارای حروف مشترک درهر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

* Means in a column having same letter are not significantly different at the 5% level as determined by Duncan's.



شکل ۲. جنین‌زایی سوماتیکی غیرمستقیم و القای شاخساره از ریزنمونه‌های برگ در *Paeonia mascula*. (a و b) بخش‌هایی از کالوس سفید و سست بترتیب تحت شرایط تاریکی و روشنایی (c) بخش هایی از کالوس جنینی زرد روشن متراکم، (d-e) القای جنین‌های سوماتیکی در مراحل مختلف نموی (جنین‌های کروی، قلبی، اژدری و لپه ای) از ریزنمونه‌های برگ طی ۴-۶ هفته از کشت بر روی محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، (f) باززایی شاخه ۸-۱۰ هفته پس از کشت در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم درلیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA.

Figure 2. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Paeonia mascula*. (a and b) White and friable sections of callus at dark and light conditions, respectively, (c) Compact bright yellow embryogenic sections of callus, (d-e) Induction of somatic embryos at different stages of development (globular, heart, torpedo and cotiledonary) from leaf explants 4-6 weeks of culture on MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with 2 $mg.l^{-1}$ BAP+ 0.5 $mg.l^{-1}$ NAA, (f) Shoots regeneration 8-10 weeks after culture on MS medium containing 1 $mg.l^{-1}$ BAP and 0.1 $mg.l^{-1}$ NAA.

در مطالعه حاضر، مراحل مختلف تکامل جنین (قلبی و اژدری) به‌طور همزمان در یک محیط مشاهده شد (شکل ۲-d, e). بلوغ و تبدیل جنین‌های سوماتیکی به گیاهان مرحله مهمی در جنین سوماتیکی است. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اصلی هستند که در کنترل‌سلول‌ها و تمایز دخیل هستند (Féher *et al.*, 2003). نقش اکسین‌ها در جنین‌زایی به‌خصوص با انتقال قطبی اکسین مرتبط است که برای ایجاد تقارن دو جانبه در طی جنین‌زایی گیاه ضروری است (Liu *et al.*, 1993). استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده برای تنظیم مقادیر جنین‌های غیرجنسی باعث تغییراتی در سطح درونی اکسین‌ها می‌شود (معمولاً تغییرات تنها در سطح IAA تعیین می‌شود). در طی جنین‌زایی، سیتوکینین‌ها در مناطق مریستمی (انتهای ریشه و ساقه) قرار دارند. یک سیگنال قوی از سیتوکینین در هسته و در سراسر سیتوپلاسم یافت می‌شود و گاهی اوقات با پلاستیدها و میتوکندری همراه است (Werner & Schmülling, 2009).

تکثیر با روش جنین‌زایی سوماتیکی، جایگزینی مناسب برای گیاهان باززایی‌شده از طریق جوانه است (Razdan & Bhojwani, 1996). جنین‌زایی سوماتیکی در گیاهان علفی توسط بسیاری از پژوهش‌گران گزارش شده است؛ از جمله تولید جنین‌های سوماتیکی از کالوس‌های حاصل از جنین بذر *P. lactiflora* (Lin *et al.*, 1987) و از کشت میکروسپور و بساک در صد تومانی‌های علفی (Roberts & Sunderland, 1977). با این حال، هیچ اطلاعاتی در این زمینه برای *Paonia mascula* در دسترس نیست.

استفاده از از تنظیم‌کننده‌های رشد از گروه اکسین‌ها جهت القای کالوس بر روی برگ‌های جوان *P. persuticosa* استفاده شده است (An, 2005).

با توجه به این‌که موفقیت باززایی هر گیاه بستگی به ژنوتیپ آن گیاه دارد، بنابراین توسعه یک روش جدید باززایی برای هر گونه از صدتومانی برای انجام کارهای بعدی لازم و ضروری است. در مطالعه حاضر ترکیب BAP با NAA برای باززایی این گونه بسیار مؤثر واقع شد. بنابراین BAP یک نقش کلیدی در باززایی صدتومانی بازی می‌کند.

ریشه‌زایی و سازگاری

حداکثر درصد ریشه‌زایی (۷۰/۵۱ درصد) و تعداد ریشه (۵/۰۲) با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (جدول ۳). ریشه‌دارشدن نه تنها یک مرحله مهم در کل فرآیند کشت بافت گیاهی است، بلکه یک گام کلیدی در ایجاد سیستم باززایی گیاهان است (Li *et al*., 2006). کاربرد اکسین خارجی (NAA)، پاسخ ریشه‌زایی را بهبود بخشید؛ که مطابق با مطالعات قبلی است (Bouza *et al*., 1994b). NAA به‌عنوان یک عامل القاء کننده ریشه‌زایی در گل صدتومانی است (Wang *et al*., 2012). اگرچه بهترین نتایج در مطالعه حاضر در ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد، اما گزارش شده است که کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA منجر به ۴۵ درصد ریشه‌زایی در *گونه Paeonia suffruticosa* شده است (An, 2005). همچنین کاربرد ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA منجر به ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی در گل صدتومانی *Paeonia suffruticosa* شده است (Li *et al*., 2006).

گزارش شده است که درصد ریشه‌زایی پس از ۳۰ روز در تاریکی ۹۵/۸ درصد و قرارگیری در شرایط تاریکی، باعث شده است تا تعداد ریشه‌های القاشده افزایش یابد (Li, 2004). در پژوهشی، ۸۳/۳ درصد از شاخساره‌های گل صد تومانی در تاریکی به‌مدت ۸ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ریشه‌دار شده‌اند (Chen, 2005). بنابراین در این مطالعه نیز جهت افزایش درصد ریشه‌زایی در گیاهچه ها، شاخساره‌های نابه‌جا به‌مدت ۱۵ روز در شرایط تاریکی قرار داده شدند.

درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر شاخه به‌طور قابل توجهی با افزایش غلظت اکسین کاهش یافت، اما برعکس طول ریشه‌ها افزایش یافت (جدول ۳) که در این حالت کیفیت ریشه‌ها (ریشه‌ها باریک‌تر و رنگ ریشه‌ها متمایل به زرد شد) و بقای گیاهان ریشه‌دار را کاهش یافت. این نتایج مشابه با یافته‌های قبلی می‌باشد که گزارش شده است که ریشه‌زایی بهتر با غلظت‌های پایین اکسین (IBA یا NAA) حاصل می‌شود (Kunneman, & Albers 1992). آنها همچنین مشاهده کردند که غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر منجر به تشکیل فراوانی کالوس‌ها و کاهش کیفیت ریشه‌ها می‌شود. چنین پاسخ ریشه‌زایی در آزمایش حاضر با افزایش غلظت NAA (۱-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌دست آمده است. بعضی از گیاهچه‌ها در طی سازگاری دچار آلودگی قارچی شده و از بین رفتند. در کل بقای بیولوژیک شاخساره‌های ریشه‌دار ۶۶/۸۷ درصد بود.

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف (NAA) بروی ریشه‌زایی در *Paeonia mascula*

Table 3. Effect of different levels of 1-naphthyleneacetic acid (NAA) on rooting in *Paeonia mascula*

Root length (cm)	Root number	Rooting (%)	Treatment NAA ($mg.l^{-1}$)
0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{d}	0
4.32^{b}	5.02^{a}	70.51^{a}	0.25
5.59^{a}	3.97^{b}	52.88^{b}	0.5
5.88^{a}	2.46^{c}	13.80^{c}	1

* میانگین‌های دارای حروف مشترک درهر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد اختلاف معنی‌دار هستند.

* Means in a column having same letter are not significantly different at the 5% level as determined by Duncan's.

نتیجه‌گیری کلی

پروتکل حاضر یک روش موفقیت‌آمیز جهت تکثیر انبوه این گونه جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی از جمله انتقال ژن و القای جهش می‌باشد. همچنین با توجه به این‌که این گیاه بومی بوده و از نظر زینتی و دارویی دارای ارزش بالایی می‌باشد، بنابراین دسترسی به یک پروتکل آسان و کارآمد، جهت تکثیر این گیاه به بقای این گیاه در زیستگاه طبیعی آن کمک می‌کند. بالاترین تعداد شاخه‌ها (۵/۳۸) در ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به‌دست آمد.

REFERENCES

1. Albers, M.R.J. & Kunneman, B.P.A.M. (1992). Micropropagation of *Paeonia*. *Acta Horticulture*, 314, 85-92.
2. An, B.Y. (2005). *Studies on the establishment of in vitro regeneration system of Paeonia suffruticosa Andr*. M.Sc. thesis. Northeast Forestry University, China.
3. Bhaskaran, S. & Smith, R.H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, 30, 1328-1336.
4. Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a revised edition. Elsevier Science.
5. Bouza, L., Jacques, M. & Miginiac, M. (1994a). *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry': development effects of exogenous hormones during the multiplication phase. *Scientia Horticulturae*, 57, 241-251.
6. Bouza, L., Jacques, M. & Miginiac, E. (1994b). Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry'. *Scientia Horticulturae*, 58, 223-233.
7. Buchheim, J.A.T. & Meyer, M.M. (1992). Micropropagation of peony (*Paeonia* spp.). In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 20 (pp. 269–285). Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg.
8. Chen, X.L. (2005). *The preliminary research on tissue culture of Paeonia suffruticosa*. MSc Thesis. Henan Agricultural University, China.
9. Fan, X.F. & Fan, X.L. (2005). Studies on the clonal bud of three species of peony. *Journal of Longdong University*, (*Natural Science Edition*), 15, 38-41
10. Féher, A., Pasternak, T. P. & Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Review of plant biotechnology and applied genetics, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), 201-228.
11. Gabryszewska, E. (1998). The influence of cytokinins, thidiazuron, paclobutrazol and red light on shoot proliferation of herbaceous peony cv. Jadwiga *in vitro*. *Journal of Fruit Ornamental Plant Research*, 6, 157-169.
12. Gabryszewska, E. (2010). The effect of glucose and growth regulators on the organogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall. *in vitro. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18 (2), 309-320
13. Gaj, M.D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* Heynt. *Plant Growth Regulators*, 43, 27-47.
14. Grando, M. F., Franklin, C.I. & Shatters, R.G. (2002). Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass (*Paspalum notatum* Flügge) seed explants for genetic manipulation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 71, 213-222.
15. Guo, F.Y. (2001). *Study on tissue culture of Paeonia lactiflora*. M.Sc. thesis. Beijing Forestry University, China.
16. Hosoki, T., Ando, M., Kubara, T., Hamada, M. & Itami, M. (1989). *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method. *Plant Cell Report*, 8, 243-246.
17. Jin-ding, Thomas, J.A. & Meyer M, M. Jr. (1987) *American Peony Society Bulletin*, 263, 24-30.
18. Karami, O. (2008). Induction of Embryogenic Callus and Plant Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Biological Sciences*, 8 (4), 68-72.
19. Kartha, K.K., Michayluk, M.R., Rao, K.L., Gamborg, O.L. & Constabel, F. (1974). Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plant *(Brassica napus* L. cv. 'Zephyr'). *Plant Science Letters*, 3, 265-271.
20. Kim, H.M., Shin, J.H. & Sohn, J.K. (2006) Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying. *Cryobiology*, 53, 69-74
21. Kim, Y.S. & Lee, B.K. (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledon culture of *Paeonia albiflora*. *Journal of Korean Society of Horticultural Sciences*, 37, 827-830.
22. Kong, X.S. & Zhang, M.X. (1998). Fast propagation of tree peony. *Northwest Horticulture*, 3 (4), 87-89.
23. Krikorian, A.D., Kelly, K. & Smith, D.L. (1987). Hormones in tissue culture and micropropagation. In: P.J. Davies (Editor), *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. (pp. 593-613) Martinus Nijhoff, Dordrecht.
24. Lee, B.K., Ko, J.A. & Kim, Y.S. (1992) Studies on the thidiazuron treatment of anther culture in *Paeonia albiflora*. *Journal of Korean Society of Horticultural Sciences*, 33, 384-395.
25. Li, Y.M. (2004). *Studies on the tissue culture of three cultivars of Paeonia suffruticosa Andr*. MSc Thesis. Beijing University, China.
26. Li, Z.J., Wang, G.D., Xin, S.L. & Chen, K.J. (2006). The new technology of propagation in the organization cultivation of *Paeonia suffruticosa. Journal of Laiyang Agricultural College (Natural Science)*, 23, 122-125.

27. Lin, J.J., Thomas, J.A. & Meyer, M.M. (1987). Tissue culture and embryoid formation in *Paeonia lactiflora* Pall. *American Peony Society Bulletin*, 263, 24-30.
28. Liu, C.M, Xu, Z.H., Chua, N.H. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5, 621-630.
29. Maroofi, H. (2005). Record of Paeonia mascula (*Paeoniaceae*) from Iran. *The Iran Journal of Botany*, 11 (1), 97-99. Tehran.
30. Meyer, M.M. (2012) Multiple shoot induction and rooting of *Paeonia lactiflora* 'Da Fu Gui'. African Journal of Biotechnology, 11 (41), 977-978.
31. Mol, H. & Von Arnold, S. (1991). Origin and development of embryogenic cultures from seedling of Norway spruce (*Picea abies*). *Journal of Plant Physiology*, 138, 223-230.
32. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, 473-496.
33. Nasri, F., Mortazavi, S.N., Ghaderi, N. & Javadi, T. (2013). Propagation *in vitro* of *Alstroemeria ligtu* Hybrid through direct organogenesis from leaf base. *Journal of Horticultural Research*, 21 (2), 23-30.
34. Orlikowska, T., Marasek, A. & Kucharska, D. (1998). Regeneration of *Paeonia mloksewitschii* Lom. and *P. tenuifolia* L. *in vitro* from different explants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 67, 223-227.
35. Page M. 2005. The Gardener's Peony: Herbaceous and Tree Peonies. Portland (OR): Timber Press.
36. Qin, K.J. (2004). Herbaceous peony. Beijing, China, Forestry Press, P. 76.
37. Radtke, G.M. (1983) Tissue culture of herbaceous peonies. *American Peony Society Bulletin*, 246, 19-23.
38. Rajabpoor, S., Azghandi, A.V. & Saboora, A. (2007) Effects of different concentrations of 2,4-D and BAP on somatic embryogenesis induction in saffron (*Crocus sativus* L.). *Pakistsan Journal of Biological Science*, 10, 3927-3930.
39. Rahman M. S., Islam M. N., Tahar A. & Karim M. A. (2004) Influence GA, and MH and their time of spray on morphology, yield contributing characters and yield of Soybean. *Asian Journal of plant Science*, 3, 602-609.
40. Rather, Z.A., Nazki, I.T. Qadri, Z.A. Mir M.A. Bhat K.M. & Hussain G. (2014). *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) cv. Sara Bernhardt using shoot tips. *Indian Journal of Horticulture*, 71 (3), 385-389.
41. Roberts, M. & Sunderland, N. (1977) Pollen culture of *Paeonia*. *John Innes Inst Annual Report*, 68, 60-61.
42. Sahrawat, A.K. & Chand, S. (2001) Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyls segments of *Psoralea corylifolia* Linn., an endangered and medicinally important Fabaceae plant. *Current Science*, 81, 1328-1331.
43. Shi, X.Q. & Zhang, Z.X. (2005). Callus culture of medicine organ of peony (Fenghuang Mountains). *Acta Agricultural Nucleatae Sin*, 19, 186-190Sonali, J., Sivanesan, I., Lim, L.I. & Jeong, B.R. (2013). *In vitro* zygotic embryo germination and somatic embryogenesis through cotyledonary explants of *Paeonia lactiflora* Pall. *Flower Research Journal*, 21 (1), 17-22.
44. Tariq Hossain, H. M. M., Kim, Y. H. & Lee, Y. S. (2010). The apical bud as a novel explant for high-frequency *in vitro* plantlet regeneration of *Perilla frutescen*s L. Britton. *Plant Biotechnology Report*, 4, 229-235.
45. Tian, D. (2008). *Container production and post-harvest handling of lotus (Nelumbo) and micropropagation of herbaceous peony (Paeonia)*. Ph.D. dissertation. Auburn University, Alabama, USA.
46. Tian, D., Tilt, K.M., Dane, F., Woods, F.M. & Sibley, J.L. (2010). Comparison of shoot induction ability of different explants in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Scientia Horticulturae*, 123, 385-389.
47. Verma, S.K., Yucesan, B.B., Gurel, S. & Gurel, E. (2011). Indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis from cotyledonary leaf segments of *Digitalis lamarckii* Ivan., an endemic medicinal species. *Turkish Journal of Biology*, 35, 743-750.
48. Wang, H.Y., He, S.L., Tanaka, M., Pham, T.V. & Teixeira da Silva JA (2010). Effects of 2, 4-D on callus formation in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) under different light conditions and light quality. *Floriculture Ornamental Biotechnology*, 4 (1), 99-102.
49. Wang, H.Y., He, S.L., Tanaka, M., Pham, T.V. & Teixeira da Silva, J.A. (2012). Effect of IBA concentration, carbon source, substrate, and light source on root induction ability of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets *in vitro*. *European Journal of Horticultural Sciences*, 77, 122-128.
50. Wang, Q. (2007). *Peony tissue culture and rapid propagation*. MSc Thesis. Henan Normal University, China.
51. Werner, T & Schmülling T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 527 538.
52. Wu, H.J., Yu, X.N., Teixeira da Silva J.A. & Lu, J.P. (2011). Direct shoot induction of *Paeonia lactiflora* 'Zhong Sheng Fen' and rejuvenation of hyperhydric shoots. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 39, 271-278.

53. Xie, J.X. (1987). Tissue culture of *Paeonia suffruticosa*. *Plant Physiology Communication*, 2, 53.
54. Yu, X.N., Wu, H.J., Cheng, F.Y., Teixeira da Silva, J.A. & Shen, M.M. (2011). Studies on multiple shoot induction and proliferation of *Paeonia lactiflora* Pall. 'Zhong Sheng Fen'. *Propagation of Ornamental Plants*, 11 (3), 144-148.
55. Zaerr, J. B. & Mapes, M. O. (1982). Action of Growth regulators. In: J.M. Bonga & D. J. Durzan (Eds) *Tissue Culture in Forestry* (pp. 231-255) Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
56. Zhang, G.H., Wang, H.M. & Wang, L.X. (2001). Study on tissue culture techniques for peony. *Shandong Agricultural Sciences*, 5, 16-18
57. Zhang, Q.R. (2006). *The preliminary research on tissue culture of Paeonia lactiflora Pall*. MSc Thesis. Henan Agricultural University, China.