فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۶، شماره ۲، صفحه ۳۶۶-۳۴۷، (۱۳۹۹)

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[٤] و مسلم بهمن‌کار[٥]

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)
٤- دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (ramshini_h@ut.ac.ir)
٥- دکتری، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (bahmankar_64@alumni.ut.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱٤

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 ریز نمونه دمبرگ و محیط کشت ½&A/4 MS + 0.3 mg/l 2.4-D + 2 mg/l KIN + 4 mg/l BAP + 0.30 mg/l GA3 به‌دست آمد. آزمایش بررسی القای ریشه‌زایی در گیاهچه‌های باززایی شده به‌صورت فاکتوریل برمبنای طرح بلوک‌های کامل تصادفی با پنج تکرار انجام شد. عامل‌های آزمایش شامل غلظت نمک‌ها در محیط کشت پایه (MS کامل و MS ½) و نوع تنظیم کننده رشد (IBA، NAA و IAA) بود که بیشترین درصد ریشه‌زایی در ترکیب تیماری ½ MS + 1.5 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.

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۹۱۲٦۷۸۸۷۳۸

مقدمه

پالونیا شان‌تونگ (*Paulownia shantong*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های درختی و اقتصادی دنیاست. این گیاه دولپه‌ای (2n=2x=40)، گل‌دار متعلق به تیره گل میمون Scrophulariaceae و بومی چین و ژاپن است. این درخت بسیار تندرشد بوده و به عنوان درخت امپراتور شناخته می‌شود (Ayan and Bilir, 2006). پالونیا شامل نه گونه از درختان با حجم چوب‌دهی 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 می‌کند. گونه‌های این جنس به شدت انعطاف‌پذیر و با تغییرات محیطی سازگار بوده و به‌خوبی در زمین‌های حاشیه‌ای رشد می‌کنند. این گونه-های جنگلی به دلیل تولید چوب بالا می‌توانند به عنوان یک منبع عالی از مواد خام برای صنعت سوخت‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرند (Bergman, 1998، Melhuish *et al*., 1990، Wang and Shogren, 1992).

در شرایط عادی، یک درخت پالونیای ده ساله به اندازه ۳۰ تا ٤٠ سانتی‌متر قطر داشته و حجم چوب‌دهی آن پنج وسه‌دهم مترمکعب در سال است. در شرایط مطلوب محیطی، طی پنج–شش سال چوب پالونیا قابل بهره‌برداری است (Jimenez *et al*., 2005). این جنس دارای قابلیت بالقوه برای جنگلداری و رشد درخاک‌های 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 می‌شود (Hassanabbasi *et al*., 1998). از پالونیا برای توسعه فضای سبز، ایجاد پارک و کشت توأم با انواع گیاهان زراعی در بسیاری از کشورها به‌صورت موفق به کار گرفته شده است (Jazirei, 2003). نیاز روزافزون به چوب و کاهش منابع چوبی سبب ایجاد و تشدید جنگل‌کاری با گونه‌های تندرشد شده است (Swamy *et al*., 2006).

این گیاه به‌منظور کنترل آلودگی هوا و خاک، بازسازی اراضی و به عنوان یک درخت تندرشد زینتی که سایه و گل‌های بسیار جذابی دارد مورد استفاده و توصیه قرار گرفته است (Melhuish *et al*., 1990، Wang and Shogren, 1992، Bergman, 1998). ارزش پالونیا برای تولید کود از برگ و تولید عسل با خواص دارویی از گل‌های آن به اثبات رسیده است برگ‌های پالونیا با داشتن ۸۹ درصد وزن خشک نیتروژن، تقویت‌کننده 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). گونه‌های *Paulownia* غنی از متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا و دیگر فعالیت‌های دارویی هستند که در بافت‌های درخت توزیع شده‌اند (Si *et al*., 2002، Chang *et al*., 2011، Bahri and Bettaieb, 2013).

چای و شربت شکوفه‌های پالونیا مشکلات کبد و طحال را برطرف کرده و همچنین در بهبود برونشیت تاثیرگذار است. علاوه براین پوست درخت پالونیا در طب سنتی چین برای بیماری‌های عفونی پوست مورد استفاده قرار می گیرد (Zhu *et al*., 1986، Castillo-Martínez *et al*., 2012، Si *et al*., 2013). به‌طورکلی تکثیر پالونیا از طریق قلمه‌های ساقه دشوارتر از قلمه‌های ریشه است، اما ریشه‌ها نیز به دمای بالا و حمله توسط ارگانیسم‌های بیماری‌زا حساس بوده و در صورت آسیب فیزیکی به اپیدرم و پوست یا بشره ریشه رشد آنها با مشکل روبرو می‌شود (Tang *et al*., 1980، Desai *et al*., 2015). از این‌رو تکثیر سنتی پالونیا چندان موفق آمیز نیست و به دلیل کارایی پایین تولید

در واحد سطح، حساسیت به آفات و بیماری‌ها، جوانه‌زنی ضعیف و رشد آهسته بذر توصیه نمی‌شود (Bergmann and Moon, 1997، San Jose *et al*., 2014). 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 tomentosa* و *Paulowna fortunei* 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 میانگره‌ها 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 *Poulowna fortunei* در محیط کشت MS با ترکیب تنظیم کننده رشد BAP در سطوح یک، هفت‌دهم و پنج دهم میلی‌گرم در لیتر آزمایشی انجام شد و نتایج نشان داد که جوانه جانبی در 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 تنظیم کننده 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 تنظیم کننده رشد BAP دونیم میلی گرم 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 تنظیم کننده رشد نیم میلی گرم 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).

متاسفانه 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 رویشی و ریزازدیادی پالونیا شنگ‌تونگ به‌منظور تکثیر تجاری و استفاده در برنامه‌های به‌نژادی بود.

مواد و روش‌ها

برای بررسی القای پینه، جنین‌زایی رویشی و باززایی در درخت پالونیا واریته‌ی شنگ‌تونگ، آزمایشی در سال

۱۳۹۷ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان-دانشگاه تهران انجام شد. ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و جوانه جانبی از نهال‌های شش ماهه جوان و سالم پالونیا تهیه شد. ریزنمونه‌ها برای ضدعفونی در محلول قارچ‌کش کاپتان دو گرم در لیتر حاوی چهار قطره توین ۶۰ به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند.

در مرحله بعد، ریزنمونه‌ها درون الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها 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، ریزنمونه‌ها سه مرتبه با آب مقطر دوبار استریل شستشو و برای دفع آب اضافی، روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. باید اشاره کرد که ریزنمونه‌های برگ به‌صورت دیسک‌های یک سانتی‌متر مربعی و دمبرگ نیز به اندازه ۱ سانتی‌متر تهیه شدند. محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و ترکیبات تنظیم‌کننده رشد مربوطه طبق (جدول ۱) آماده و pH آنها ۵/۸ تنظیم شد.

در محیط کشت هشت (½&$_{A/4}$ MS) منظور از $_{A/4}$ و ½ 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. استریل‌کردن محیط کشت‌ها 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.

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

Table1. Medium containing different growth regulator compositions used in *Paulownia* tissue culture

ردیف Row	GA3 (mg/L)	BAP (mg/l)	KIN (mg/l)	TDZ (mg/l)	2.4-D (mg/l)	محیط کشت Medium
1				2	0.3	MS
2				2	0.3	$_{A/2}$ MS
3			0.5		0.5	MS
4			0.5		0.5	½ MS
5	0.30	4	2		0.3	MS
6	0.30	4	2		0.3	$_{A/2}$MS
7	0.30	4	2		0.3	$_{1/2}$MS
8	0.30	4	2		0.3	½&$_{A/4}$ MS

ریزنمونه‌های کشت‌شده در اتاقک رشد و در دمای ۲۵-۲٤ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۷۲۰ لوکس نگهداری شدند. پس از حدود سه هفته علایم پینه‌زایی در پتری‌ها مشاهده شد. سپس پینه‌ها به مدت دو هفته به تاریکی منتقل و در انتهای این دوره خصوصیاتی مانند سرعت پینه‌زایی، درصد پینه‌زایی، مساحت پینه، درصد پینه‌های جنین‌زا و درصد باززایی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری مساحت پینه از نرم‌افزار Digimizer استفاده شد (Bahmankar *et al.*, 2017). واکشت ریزنمونه‌ها هر ٤ هفته یک‌بار در محیط کشت جدید صورت گرفت.

پس از باززایی گیاهچه‌ها به‌منظور القایی ریشه‌زایی در آنها، آزمایشی بصورت فاکتوریل با سه عامل محیط کشت (MS کامل و MS ½)، نوع تنظیم‌کننده رشد (IBA، NAA و IAA) و غلظت‌های تنظیم‌کننده رشد (یک میلی‌گرم در لیتر و یک و نیم میلی‌گرم درلیتر) طبق (جدول ۲) و بر مبنای طرح بلوک کامل تصادفی با پنج تکرار صورت پذیرفت.

جدول ۲- محیط‌های کشت (کامل MS و MS ½) حاوی غلظت‌های مختلف ترکیب تنظیم‌کننده رشد NAA، IBA و IAA برای القای ریشه‌زایی

Table 2. Medium (complete MS and ½ MS) containing different concentrations of growth regulator composition NAA, IBA and IAA for rooting induction

ترکیبات تنظیم کننده 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

گیاهچه‌های کشت‌شده به‌مدت سه هفته در اتاقک رشد در شرایط دمایی ۲±۲٤ 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 نرمال‌بودن داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه دانکن (DMRT, $P \leq 0.05$ & $P \leq 0.01$) 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 ٦۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا ژل محیط کشت سست شود و هنگام خارج کردن نمونه ها از ظروف کشت صدمه ای 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 کاملا از ریشه تمیز شد. پس از شسته شدن ژل از ریشه، گیاهان به داخل گلدان‌هایی به حجم ۵۰۰ 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 ٤ 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 وگیاهان 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 به‌جز 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 ٤).

جدول ٤- 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

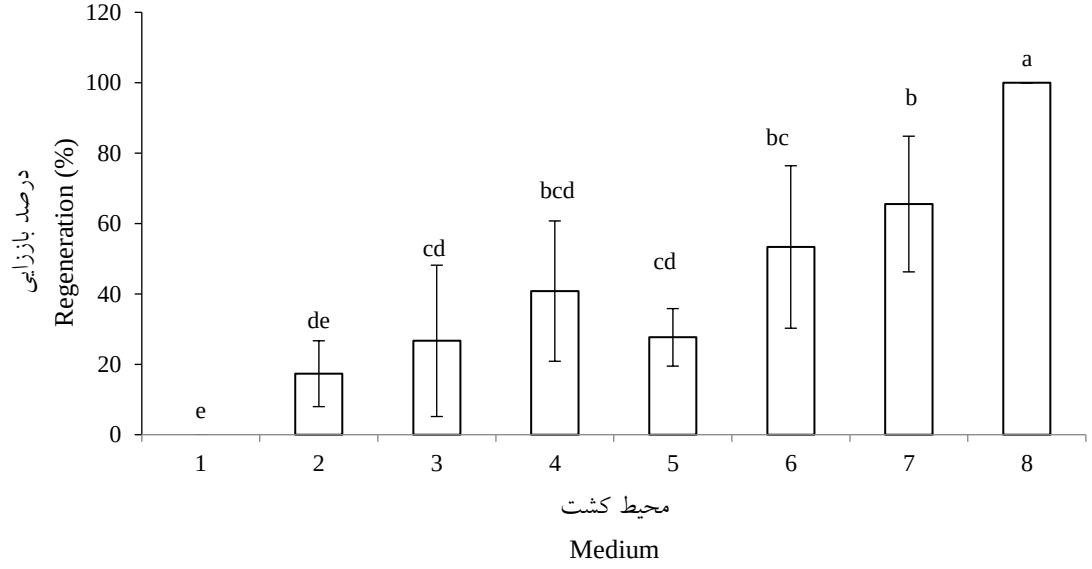
منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	القای پینه‌زایی (درصد) Induction callus (%)	زمان القای پینه (روز) time of induction callus (day)	مساحت پینه‌دهی (سانتی‌متر) callus rate (cm)	پینه جنین‌زا (درصد) Callus embryogenesis (%)	باززایی جنین‌های رویشی (درصد) Regeneration of somatic embryogenesis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

** 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

نتایج حاصل از مقایسه میانگین محیط کشت‌های پایه MS ½، A/2 MS، ½&A/4MS 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 ٥) 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، ٢٤ و ۲۸ ایجاد می‌شود و تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. کد تیماری ۲۳ و ٢٤ نشان می‌دهد که درصد القای پینه‌زایی در ریزنمونه برگ در دو محیط (MS کامل و MS ½) یکسان است. طبق 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 ٢٤، 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 ۳/٦ سانتی‌متر است. مساحت پینه در ریزنمونه دمبرگ بطور یکسان در محیط‌های کشتMS ½ افزایش پیدا کرد. همچنین در ریزنمونه برگ، بالاترین مساحت در کد تیماری ٢٤ و ۲۸ و در ریزنمونه جوانه جانبی، بالاترین مساحت با کد ۳۸ و ٣٤ مشاهده شد. طبق پژوهش‌های

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 ٢٤، ٢٧ و ٢٨ حاصل شد که تفاوت معنی داری 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 مغذی کاهش و محیط MS کامل به MS ½ تبدیل شد، بیشترین درصد پینه جنین‌زا در آنها مشاهده‌شد. 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 ١٦، 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.



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 جنین های 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

row	کد تیماری Code treatment	مشخصات کد تیمار به ترتیب از راست به چپ Specification of the treatment code from right to left	القای پینه‌زایی (درصد) Induction callus (%)	زمان القای پینه (روز) Time of induction callus (day)	مساحت پینه دهی (cm) Callus rate (cm)	پینه جنین‌زا (درصد) Callus embryogenes (%)	باززایی جنین‌های رویشی (درصد) Regeneration of somatic embryogenesis (%)
1	11	محیط کشت 1+ دمبرگ Medium1 + Petiole	20^{e}	30^{a}	0.7^{d}	0^{d}	0^{b}
2	12	محیط کشت 2+ دمبرگ Medium2 + Petiole	68^{bc}	24.6^{a}	1.2^{d}	16^{cd}	8^{b}
3	13	محیط کشت 3+ دمبرگ Medium3 + Petiole	40^{b}	20^{b}	2.3^{c}	13^{cd}	40^{b}
4	14	محیط کشت 4+ دمبرگ Medium4 + Petiole	64^{bc}	12^{b}	3.1^{b}	50^{b}	36.4^{b}
5	15	محیط کشت 5+ دمبرگ Medium5 + Petiole	60^{c}	28^{a}	2.3^{c}	32^{bc}	33^{b}
6	16	محیط کشت 6+ دمبرگ Medium6 + Petiole	40^{b}	30^{a}	2.8^{bc}	50^{b}	60^{a}
7	17	محیط کشت 7+ دمبرگ Medium7 + Petiole	80^{ab}	23^{a}	3.2^{ab}	85^{a}	70^{a}
8	18	محیط کشت 8+ دمبرگ Medium8 + Petiole	92^{a}	17^{b}	3.6^{a}	100^{a}	100^{a}
9	21	محیط کشت ۱+ برگ Medium1 + leaf	4^{d}	10^{d}	0.3^{d}	0^{c}	0^{c}

ادامهٔ جدول ۵.

Continued table 5.

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

ادامهٔ جدول ۵.

Continued table 5.

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

بیشتر پینه‌های که از ریزنمونه برگ و دمبرگ برروی محیط کشت MS+0.30+mg/l 2.4-D 2 mg/1 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 ½&A/4 MS + 0.3 mg/l 2.4-D + 2 mg/l 2.4-D + 4 mg/l KIN + 0.30 mg/l G3 در ریزنمونه برگ به‌دست 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 ½&A/4 MS + 0.3 mg/l 2.4-D + 2 mg/l 2.4-D + 5 mg/l KIN + 0.30 mg/l GA3 مشاهده شد، همچنین جنین‌های که از 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 ½&A/4 MS + 0.3 mg/l 2.4-D + 2 mg/l 2.4-D + 4 mg/l KIN + 0.30 mg/l GA3 تشکیل شدند (شکل ۲-٤). گیاهچه‌های که در محیط کشت ½&A/4 MS + 0.3 mg/l 2.4-D + 2 mg/l 2.4-D + 4 mg/l KIN + 0.30 mg/l GA3 بدست آمده بودند، برگ‌های سالم‌تر و شاداب‌تری داشتند (شکل ۲-۵). پس از گذشت دوهفته تشکیل جنین‌زای رویشی، برگ های اولیه از جنین‌های رویشی بالا آمدند (شکل ۲-٦).

شکل ۲– ۱. پینه‌های جنین‌زا ازریزنمونه برگ در محیط کشت ½&A/4 MS + 0.3 mg/l 2.4-D + 2 mg/l 2.4-D + 4 mg/l KIN + 0.30 mg/l GA3. ۲. پینه غیر جنین زا در محیط کشت TDZ + 2 mg/l 2.4-D + 0-3 mg/l. ۳. باززایی جنین‌ها از پینه‌های جنین‌زا +MS. ٤. مراحل جنین‌های قلبی شکل از ریزنمونه دمبرگ 5– گیاهچه باززا شده. 6– مشاهده مرحله دو برگی از جنین‌های باززا شده.

Figure 2. 1- Callus embryogenic of explant leaf in medium ½&A/4 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.

مقایسه میانگین القایی ریشه‌زایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی شامل درصد ریشه‌زایی، طول ریشه و تعداد ریشه حاکی از آن بود که اثر متقابل سه گانه محیط کشت MS، غلظت تنظیم کننده رشد و نوع تنظیم کننده رشد بر روی آن ها در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ٦).

جدول ٦- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده برای ریشه‌زایی پالونیا

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

تعداد ریشه Root number	طول ریشه (سانتی‌متر) Length root (cm)	ریشه‌زایی (درصد) Rooting (%)	df	منبع تغییرات Source of variation
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 × Gowth 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

با توجه به اینکه که اثرهای متقابل در جدول تجزیه واریانس معنی‌دار 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. اثراکسین‌های مختلف NAA، IAA و IBA با دو نوع غلظت (۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) در دو محیط کشت MS کامل و MS ½ 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 MS½، کشت شده بودند ریشه‌ی کمتری داشتند. بررسی‌ها نشان داد که در محیط کشت MS کامل با ترکیب تیمار تنظیم‌کننده رشد IBA، نسبت به ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد NAA و IAA درصد ریشه‌زایی به ۵۸ و ۷۰ درصد رسید. در حالی که در محیط کشت MS ½ 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 MS ½) همراه با ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IBA رشد کردند کیفیت بالایی داشتند و با افزایش غلظت IBA درصد ریشه‌زایی افزایش پیدا کرد. این پژوهش‌ه نشان می‌دهد در ترکیب تیماری تنظیم‌کننده رشد NAA بالاترین میانگین ریشه‌زایی (۵۲ درصد) درکد تیماری ۲۱۲ مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری با کد ۲۲۲ دارد همچنین می‌توان دریافت که با فزایش غلظت تنظیم-کننده رشد NAA، درصدریشه‌زایی کاهش می‌یابد. ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IAA در محیط کشت ½ MS بیشترین ریشه‌زایی را با میانگین (۵۰ درصد) داشت

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 (٤/٨ 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 کیفت پایینی بودند. طبق بررسی‌های انجام‌شده، بالاترین تعداد ریشه در محیط MS ½ همراه با ترکیب تیماری تنظیم کننده رشد IBA (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) دیده شد. با افزایش غظلت 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.

شکل ۳- ریشه‌زایی پالونیا شان تونگ 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 ریشه زایی برای در صد ریشه‌زایی، طول ریشه زایی (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 Root number	طول ریشه (سانتی‌متر) Length root (cm)	ریشه‌زایی (درصد) Rooting (%)	مشخصات کد تیمار از راست به چپ Specification of the treatment code from right to left	کد تیماری Treatment code
		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

ادامهٔ جدول ۷.

Continued table 7.

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

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 برگزارش-های 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، جوانه جانبی 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) درصد القای پینه در ریزنمونه برگ، در گیاه (*Polygonatum verticillatum*) در دو محیط (MS کامل و ½ MS) با ترکیب تنظیم کننده رشد 1 mg/l 2.4-D + 1 mg/l TDZ، ٤٥ درصد به‌دست آمد و اختلاف معنی‌داری بین دو محیط کشت مشاهده نشد. به نقل از Yi و همکاران (2009) در گیاه *Anthurium andraeanum* نیز بیشترین القای پینه در ریزنمونه برگ و دمبرگ در محیط کشت MS ½ دیده شد. در محیط کشت هشت با کاهش چهار برابر عناصر ماکرو و کاهش دو برابر عناصر میکرو، ویتامین‌ها و آهن در محیط کشت، افزایش درصد القای کالوس در محیط کشت صورت گرفت.

در گیاه *Anthurium andraeanum* بر اساس گزارش Aawath and Satyan (2018) بیشترین القاء پینه در ریزنمونه برگ و محیط کشت MS ½ که حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2.4-D به ترتیب با غلظت‌های ٤/٤ و ١/٤ میکرومولار مشاهده شد. نتایج پژوهش‌های Tiwari and Chaturvedi (2018) نشان داد که کوتاه‌ترین زمان (۲۷ روز) القای پینه در ریزنمونه برگ درترکیب تیمار تنظیم کننده رشد MS + 1 mg/l

2.4-D + 1 mg/l TDZ در گیاه *Polygonatum verticillatum* 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 احتمالا به همین دلیل، برخی از گیاهان به مقادیر بسیار بالاتری از تنظیم کننده 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) به‌دست 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 تنظیم کننده رشد اکسن سبب تحریک القای پینه‌زایی و فاصله زمانی کمتر القای پینه می‌شود (Liu *et al*., 1993).

پژوهشگران دریافتند که گیاه آنتوریوم در محیط ½ 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 کالیفرنیایی (*Populus tomentosa*) نشان دادند که بالاترین باززایی ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت ½MS 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 به‌دست می‌آمد. بر اساس بررسی Jamar and Krens (1989) بر روی گیاه L- Be*ta vulgaris*، از بین دو محیط کشت ½MS و PGo ریزنمونه دمبرگ در محیط ½ MS بالاترین باززایی را داشت.

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. به‌نظر می‌رسد بافت برگ و دمبرگ درخت سرخدار نسبت به 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 ½ همرا با ۰/٦ میلی گرم در لیتر BAP، نسبت به محیط کشت B5 ½ داشت (Koli *et al*., 2009). در گزارشی نشان داده شد که محیط DKW ½ 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 ٤/٤ 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

این پژوهش نشان داد در محیط کشت MS ½ و MS کامل با افزایش ترکیب تنظیم‌کننده رشد IBA (از یک میلی‌گرم در لیتر به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت IBA در محیط کشت، درصد و کیفیت ریشه‌زایی افزایش یافت. نتایج نشان داد با افزایش ترکیب تنظیم-کننده رشد NAA درصد ریشه زایشه‌زایی کاهش یافت و ریشه‌های به‌دست آمده دارای کیفت پایینی بودند.

در پژوهشی که روی تکثیر ریشه‌زایی درون-شیشه‌ای گیاه *Spilanthes acmella* با استفاده از محیط کشت MS ½ 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 لیترمشاهده شد و ریشه‌هایی که به‌دست آمده نسبت به ترکیب تنظیم‌کننده رشدNAA ، طویل‌تر، سالم‌تر و کیفت 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 میلی‌گرم در لیتر اتفاق می‌افتاد. همچنین در بررسی دیگر Chunchukov و همکاران (2015) گزارش کردند موفقیت‌آمیزترین ریشه‌زایی درون شیشه‌ای، هنگامی به‌دست می‌آید که گیاهان در محیط کشت MS ½ حاوی IBA (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گیرد. Benmahioul و همکاران (2009) نشان دادند که شاخسارهای *Pistacia vera* بر روی محیط MS کامل همراه با ترکیب هورمونی ۱۲/۳ میکرومولار IBA، ریشه‌دار شدند. در بررسی این‌ویترو و ژربرا مشخص شد که محیط ۰/۵ میلی‌گرم 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 a.l*, 2009). در پژوهشی در محیط WPM ½ همراه با ۳ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم 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 ½ با ترکیب تنظیم‌کننده رشد NAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر درصد شاخسارهای ریشه‌دار به ۹۸ درصد رسید با غظلت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA درصد ریشه زایی 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 ½ به‌دست آمد. براساس گزارش Roy و همکاران (2007) ریشه‌زایی گیاه *Averrhoa carambola* در محیط MS ½ در ترکیب تیمار تنظیم کننده رشد IAA و IBA با غلظت ۰/۲۵ میلی‌درلیتر درصد ریشه زایی به ٦۰ رسید درحالی که ۸۸ درصد ریشه‌زایی زمانی حاصل شد که ترکیب تیمار IAA و IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم 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 تنظیم کننده رشد NAA در سه غلظت ۰/۵، ۱/۵، ۲ انجام شد بیشترین طول ریشه درغلظت ۲ میلی‌گرم درلیتر مشاهده شد و طول ریشه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به ۵ سانتی‌متر رسید. ریشه‌های که در اثر تنظیم‌کننده رشد NAA، علی الخصوص ریشه‌های که در غلظت بالا به‌وجود آمدند دارای کیفت پایین‌تر و شکننده بودند. همچنین نتایج نشان داد ریشه‌های که در غلظت بالای تنظیم کننده رشد IBA به‌وجود آمده بودند کیفیت بهتری داشتند (Banilas and korkas, 2007). در پژوهشی بر روی

گیاه *Salvia fruticosa* Mill افزایش تعداد ریشه در ترکیب تنظیم کننده رشد IBA بیشتر از تر کیب 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 MS ½ زمانی به‌دست آوردند که غلظت IBA از ۰/۱ میکرمولار به ۰/۵ میکرومولار افزایش یافت (Nisha and Mohammad, 2018). پژوهش‌های انجام‌شده توسط Roy PK (2015)، نشان داد در محیط کشت MS ½ با غلظت بالای تنظیم کننده رشد NAA (از ۱/۵ به ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) تعداد ریشه (از ۱۲–۱۰ به ۸– ٦) 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.
- Benmahioul, 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*

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 differentpaulownia species and its plantlet regeneration. *Journal of forestry Research*, 12(4):209-14.
- Hassanabbasi, 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. Rodrı, 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. *Southerm Jaurnal of Applied Forestry*, 4:19-24.
- Tawfik, G.A. & A. Noga, 2002. Cumin regeneration fromseedling 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.Dumani [1], S. M. M. Mortazavian[*2], A. Izadi Darbandi[3], H.Ramshini [4] and M. Bahmankar[5]

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 ½&$_{A/4}$ *MS + 0.3 mg/l + 2mg/l KIN + 4 mg/l BAP + 0.30 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 1/2MS medium) in combination with hormones of IBA, NAA and IAA. The highest percentage of rooting was observed in ½MS 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