فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۸، شماره ۱، صفحه ۷۹-۵۹، (۱۴۰۱)
DOI: 10.30466/jfrd.2021.53838.1569
DOR: 20.1001.1.24763551.1401.8.1.5.3

مقالهٔ پژوهشی

برهم‌کنش عناصر غذایی، pH و پتانسیل اسمزی محیط کشت بر کالوس‌زایی و جنین‌زایی درخت پائولونیا در شرایط درون شیشه‌ای

یاسین دومانی[۱]، سید محمدمهدی مرتضویان*[۲]، علی ایزدی دربندی[۳] و حسین رامشینی[٤]

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

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰٦/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۸/۱۷

چکیده

پائولونیا درختی تندرشد، صنعتی و زینتی با خواص دارویی است. این پژوهش برای بررسی پتانسیل اسمزی محیط کشت پایه MS تحت تأثیر عناصر درشت و ریزمغذی انجام شد؛ همچنین تأثیر پتانسیل اسمزی روی القای کالوس، جنین سوماتیکی، باززایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و تنوع سوماکلونال انجام شد. آزمایش، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و شامل دو شاخص، ریزنمونه (برگ و دمبرگ) و ۸ نوع محیط کشت حاوی ترکیبات مختلف عناصر محیط کشت همراه با ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی انجام شد. نتایج نشان داد بالاترین میزان القای کالوس، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی در محیط‌هایی با یک دوم و یک چهارم برابر عناصر درشت مغذی محیط کشت MS مشاهده شد. با کاهش عناصر درشت‌مغذی به‌ویژه منابع نیترات در محیط کشت، فعالیت آنتوسیانین، کلروفیل، تعداد جنین و پتانسیل اسمزی افزایش یافت. با این حال سرعت رشد کالوس و تنوع سوماکلونال کاهش یافت. در محیط کشت ۸، کالوس‌ها و کالوس‌های‌جنین‌زا بدون سوختگی، شفاف، گیاهچه‌های باززاشده شاداب‌تر و در برگ‌های گیاهچه‌ها بیشترین رنگ‌دانه‌ها مشاهده شد. در محیط‌های کشت MS کامل، القای کالوس، جنین‌سوماتیکی، پتانسیل اسمزی، آنتوسیانین و محتوای کلروفیل کاهش یافت، درحالی‌که سرعت رشد کالوس و تنوع سوماکلونال افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، القای کالوس، پتانسیل اسمزی، تنوع سوماکلونال، جنین‌سوماتیکی.

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۹۱۲٦۷۸۸۷۳۸

مقدمه

پائولونیا با نام علمی (*Paulownia sp*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های درختی و اقتصادی دنیا، متعلق به خانواده Paulowniaceae (Scrophulariacae) و بومی چین است. امروزه بیش از ۲۰ جنس از آن شناخته شده است. مدت زمان وارد شدن پائولونیا به مرحلهٔ تولید مثل بسیار کوتاه است، به‌همین دلیل در شرایط مطلوب محیطی، طی چهار تا پنج سال چوب پائولونیا قابل بهره‌برداری است. چوب پائولونیا برای تولید نئوپان، کبریت سازی، کاغذ و کارتون‌سازی، لایه‌بری، مبل‌سازی، تولید ابزار موسیقی، جعبهٔ دارو و ساخت لوازم تزئینی و صدها مصارف دیگر استفاده می‌شود (Yadav et al., 2013). درخت پائولونیا برای توسعهٔ فضـای سـبز، ایجاد پارک و کشت توأم با انواع گیاهان زراعی در بسیاری از کشورها به‌صورت موفق به‌کارگرفته شده است (Yadav et al., 2013). درخت هشت تا ۱۰ سالهٔ پائولونیا حدود ۱۰۰ کیلوگرم ترکیب سبز (برگ) و حدود ۲/۸ – ۳ درصد نیتروژن و ٤ درصد پتاسیم تولید می‌کند (Woods, 2008). زراعت چوب پائولونیا اصلی‌ترین منبع چوب در جهان است، از این‌رو کشاورزان اروپایی با پیروی از سیاست کشت آمیخته و توسعهٔ سطح زیرکشت گیاهان تندرشد، به‌تدریج کشت این نوع گیاهان را گسترش می‌دهند (Zuazo et al., 2013). کنوانسیون کیوتو از بین گیاهان، کاشت درخت پائولونیا در مناطق آلوده و صنعتی را به‌دلیل تولید بالای اکسیژن (هر درخت سالانه مولد ٦ کیلوگرم اکسیژن) و جذب بالای دی‌اکسیدکربن (هر هکتار سالانه ۱۲۵۰ تن دی‌اکسید کربن را جذب می‌کند) توصیه کرد (Huseinovic et al., 2017). عملکرد یونجه در هر هکتار بین ۳ تا ۳/۵ تن است و مقدار پروتئین آن بین ۱۰ تا ۱۵ درصد است، درحالی‌که در هر هکتار پائولونیا ٦۲ تن کود برگی تولید می‌شود و پروتئین آن بین ۲۳ تا ۲٤ درصد است که قابل قیاس با یونجه نیست؛ از این‌رو پائولونیا می‌تواند جایگزین بسیار خوبی برای یونجه باشد (Yadav et al., 2013). رونق بالای پائولونیا منبع خوبی برای تولید عسل است (Yadav et al., 2013) سالانه در هر هکتار ۷۰۰ کیلوگرم عسل تولید می‌شود. عسل پائولونیا رنگ و کیفیت بالاتری از *Robinia pseudoacania* L. دارد. درخت پائولونیا جاذب عناصر سنگین و گازهای سمی در خاک و هواست و از سوی دیگر سبب تصفیهٔ گرد و غبار هوا و ذرات معلق در هوا می‌شود. کشور بوسنی و هرزگوین که جزو یکی از کشورهای آلوده به عناصر سنگین است با کاشت درخت پائولونیا تا حدودی بر این مشکل غلبه کرده است (Huseinovic et al., 2017). کشت بافت گیاهی به‌عنوان یکی از ابزارهای مهم تکثیر غیرجنسی می‌تواند راه حلی برای مشکلات تکثیر این گیاه از طریق قلمه باشد. القای جنین‌های سوماتیکی که به‌طور مستقیم از بافت‌های بالغ درخت یا کمینه از بافت‌های غیر بذر مانند اندام‌های برگ و یا بخش‌های ساقه گرفته می‌شود اهدافی مهم در کشت بافت گونه‌های جنگلی است (Clapa et al., 2014). روش اصلی تکثیر بسیاری از گونه‌های چوبی با بذر است؛ درحالی‌که امروزه تکثیر سنتی به‌دلیل مشکلاتی مانند جوانه‌زنی ضعیف بذر، رشد آهسته، حساسیت به آفات و بیمارها، قلمه‌زنی و کارآیی پایین آن در واحد سطح، چندان موفق نیست. به‌همین دلیل تأکید بر لزوم توسعهٔ سیستم‌های قابل اعتماد برای تولید جنین سوماتیک است (Jain and Gupta, 2018). علاوه‌بر موارد فوق، از آنجایی که تکثیر پائولونیا از طریق کشت بذر با مشکلات متعددی مانند تولید گیاهچهٔ ضعیف، عدم تولید گل و بذر در این گیاه در سال‌های اولیهٔ رشد و احتمال وقوع تفرق در گیاهان حاصل از جوانه‌زنی بذر

مواجه است، از این‌رو این ضرورت را ایجاب می‌کند که از دیگر روش‌های تکثیر گیاهان مانند کشت بافت گیاهی در تولید آن بهره برد (Yadav et al., 2013). ترکیبات محیط کشت بافت از عوامل مهم محیطی در ایجاد تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از کشت درون شیشه است. پتانسیل اسمزی در محیط‌های کشت نقش مهمی بر رشد سلول‌های گیاهی، بافت و اندام و ریخت‌زایی دارد (Ramarosandratana et al., 2001). افزودن اجزای محیط کشت، به‌ویژه عناصر درشت مغذی و ریز مغذی و منابع کربن، نشان‌دهندهٔ تغییر پتانسیل اسمزی در محیط کشت است. Shi et al. (2009) اظهار کردند که بالاترین درصد کالوس جنین‌زا و القای کالوس در ریزنمونهٔ درخت *Cinnamomum camphora* L. و پتانسیل اسمزی بالا با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر ساکارز در محیط کشت مشاهده شد. در پژوهشی دیگر افزایش پتانسیل اسمزی در محیط کشت، مقدار کالوس‌زایی و القای جنین سوماتیکی را افزایش داد، که علت این امر ثابت بودن pH محیط کشت گزارش شد. در همین حال مشخص شد ریزنمونه‌های کشت‌شده در پتانسیل اسمزی بالا مواد غذایی بالایی مصرف کرده و سلول‌های درحال‌رشد در کمترین زمان، به بیشترین مقدار رشد خود می‌رسند (de Paiva and Otoni, 2003). هدف از این پژوهش، بررسی اهمیت پتانسیل اسمزی محیط کشت بر القای جنین سوماتیکی، باززایی، جلوگیری از احتمال وقوع تفرق، تنوع سوماکلونال و ایجاد فنوتیپ‌های متفاوت است که از طریق عناصر موجود در محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشد و منبع کربن ایجاد می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از سه گونه درخت پائولونیا با نام‌های *Paulownia shantung*، *Paulownia elongata* و *Paulownia fortune* برای بررسی القای کالوس، جنین‌زایی سوماتیکی، باززایی و بررسی پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت در سال ۱۳۹۶ استفاده شد. این آزمایش در گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات دانشکده ابوریحان دانشگاه تهران اجرا شد. ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ از نهال‌های شش ماههٔ جوان و سالم گونه‌های مذکور تهیه شد. ابتدا ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ برای ضدعفونی در محلول قارچ‌کش کاپتان دو گرم در لیتر حاوی چهار قطره توین ۶۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. در مرحلهٔ بعد، ریزنمونه‌ها درون الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه غوطه‌ور شده و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس ریزنمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه درون محلول هیپوکلرید سدیم دو درصد قرار داده شدند و ظرف حاوی آن‌ها به زیر هود لامینار منتقل شد. ریزنمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. محیط کشت مورد استفاده، موراشیک و اسکوگ (MS) بود. ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد گیاهی طبق (جدول ۱) آماده و pH آن‌ها روی ۵/۸ تنظیم شد. استریل کردن محیط‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. این پژوهش از دو آزمایش پیاپی تشکیل شده است. آزمایش اول برای ریزازدیادی و بررسی پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت انجام شد. در این مرحله، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از دو شاخص، شامل ریزنمونه (برگ و دمبرگ) و محیط کشت (هشت نوع محیط کشت حاوی ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد) در چهار تکرار انجام شد. در داخل هر پتری‌دیش پنج ریزنمونه کشت شد. آزمایش دوم، پس از تشکیل

جنین‌ها روی محیط‌های کشت برای بررسی تنوع سوماکلونال از نظر صفات بیوشیمیایی شامل کلروفیل و محتوای آنتوسیانین انجام شد. در این آزمایش، بیشتر جنین‌ها که در مرحله کوتیلدنی بودند برای استخراج کلروفیل و آنتوسیانین انتخاب شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجراشد. شایان ذکر است برای شناسایی جنین‌ها و مرحله رشدی آن از استریومیکروسکوپ استفاده شد.

جدول ۱- محیط‌های کشت حاوی ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در بررسی کشت بافت پائولونیا

Table1- Media containing different hormonal compositions used in Paulownia tissue culture study

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
½ MS	0.5	-	0.5	-	-	4
MS	0.3	-	2	4	0.30	5
A/2MS	0.3	-	2	4	0.30	6
1/2MS	0.3	-	2	4	0.30	7
½&A/4 MS	0.3	-	2	4	0.30	8

½&A/4: مقدار چهار برابر کاهش نمک‌های معدنی در محیط کشت

A/2: مقدار دو برابر کاهش نمک‌های معدنی درشت مغذی در محیط کشت

1/2: مقدار دو برابر کاهش عناصر درشت مغذی در محیط کشت

½&A/4: Reduction to half than twice the entire contents of the medium and reduction to a quarter of the macronutrients in the MS medium.

A/2 :Reduction to half of macronutrients in the MS medium.

1/2 :Reduction to half the entire MS medium content.

برای سنجش غلظت کلروفیل، ۰/۲ گرم نمونه جنینی که در مرحله کوتیلدنی بود در استون ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد (Lichtenthaler, 1987). سپس عصارهٔ حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و تا رسیدن به حجم ۲۵ میلی‌لیتر و استخراج کامل کلروفیل به آن استون اضافه شد.

رابطهٔ (۱)
$$\text{Chlorophyll a (کلروفیل a)} = [12.7\,(D663) - 2.69\,(D645)] \times \frac{V}{1000W}$$

رابطهٔ (۲)
$$\text{Chlorophyll b (کلروفیل b)} = [22.9\,(D645) - 4.68\,(D663)] \times \frac{V}{1000W}$$

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین طبق روش (Wagner, 1997) مقدار ۰/۲ گرم از جنین‌ها در مرحله کوتیلدنی در ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی که شامل متانول و کلریدریک اسید به نسبت ۹۹ به یک است به‌طور کامل ساییده شد. سپس عصاره حاصل، سانتریفوژ شده و محلول رویی به‌مدت یک شب در تاریکی قرار گرفت. مقدار جذب در ۵۵۰ نانومتر جذب نوری کلروفیل a و b به‌ترتیب در طول موج‌های ٦٤٥ و ٦٦٣ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول مربوطه، غلظت کلروفیل a و b و کلروفیل کل بر حسب میلی گرم بر گرم به‌دست آمد.

خوانده شد. برای محاسبه غلظت، از ضریب خاموشی(ε=۳۳۰۰۰ mol-2cm-۱) استفاده شد.

برآورد اجزاء واریانس

نظر به اینکه ضریب تغییرات یک مقدار مطلق و بدون واحد اندازه‌گیری است، از این‌رو مبنای خوبی برای مقایسهٔ تنوع موجود بین صفات با واحدهای اندازه‌گیری متفاوت است. با فرض یکنواختی ژنتیکی جنین‌ها و کالوس‌های مورد آزمایش، میانگین مربعات بین گونه‌ها از دو جزء تشکیل شده است: الف- اختلاف بین جنین‌ها و کالوس‌ها ب- تغییرات محیطی بین اجزاء مربوط به جنین‌ها و کالوس‌ها. از این‌رو خواهیم داشت:

رابطه (۳): میانگین مربعات خطای آزمایش = واریانس محیطی VE=MSe

رابطه (٤): واریانس ژنتیکی (VG) $VG = \frac{MSg-Mse}{r}$

رابطه (٥): واریانس فنوتیپی (Vp) $Vp = VG + VE$

رابطه (٦): ضریب تغییرات فنوتیپی (PCV) $PCV= \frac{\sqrt{Vp}}{\dot{x}}$

رابطه (۷): ضریب تغییرات ژنوتیپی (GCV) $GCV = \frac{\sqrt{VG}}{\dot{x}}$

رابطه (۸): ضریب تغییرات خطا (ECV) $ECV = \frac{\sqrt{VE}}{\dot{x}}$

رابطه (۹): وراثت پذیری عمومی (H2b) $H2b = \frac{VG}{VP}$

رابطه (۱۰): پیشرفت یا سود ژنتیکی (G_A) $GA = i.h.\sqrt{Vp}$

در رابطه ۱۰ سود ژنتیکی i نمایانگر دیفرانسیل گزینش استاندارد شده است. از آنجا که شدت انتخاب کالوس‌ها برای القای جنین، ۵ درصد درنظر گرفته شد، مقدار i در این فرمول برابر با ۲/۰٦ در نظر گرفته شد. کالوس‌هایی که دارای سرعت رشد بالا، شیری رنگ، تقریباً مایل به سبز و وارد مرحله قلبی شده بودند، برای القای جنین سوماتیکی انتخاب شدند. شایان ذکر است برای اطمینان از یکنواختی ژنتیکی ریزنمونه‌ها، تمام ریزنمونه‌ها از یک گیاه به‌عنوان پایه مادری تهیه شدند.

اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت

اندازه‌گیری پتانسیل محیط‌های کشت با استفاده از دستگاه OSL/Kg (مدل دستگاه OSMOMAT 030) در دو مرحله انجام شد. مرحلهٔ اول، بعد از آماده‌کردن محیط‌های کشت و اندازه گیری pH قبل از اضافه کردن آگار انجام شد. مرحلهٔ دوم، بعد از ٢٤ روز و مصادف با واکشت کردن ریزنمونه‌ها انجام شد. برای اندازه‌گیری اختلاف پتانسیل اسمزی از آزمون T جفت شده، استفاده شد. برای اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی ۱۰ پتری‌دیش از هر محیط کشت انتخاب شد و برای اینکه بتوانیم آگار را از محیط‌های کشت تا حدودی جدا و محیط‌های جامد را به محیط‌های محلول تبدیل کنیم، محیط‌های کشت به‌صورت جداگانه در بن‌ماری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محلول‌های محیط‌های کشت را از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر عبور دادیم و هنگامی که دمای محیط‌های فیلتر شده به ۲۵ درجه سانتی‌گراد رسید، پتانسیل اسمزی آن‌ها اندازه‌گیری شد. قابل توجه است برای اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت، هر کدام از محیط‌های کشت به‌صورت مجزا انتخاب و اندازه‌گیری شدند. همچنین برای افزایش دقت، کلیه اندازه‌گیری‌های مربوط به هر سه گونه به‌صورت هم‌زمان انجام شد. بعد از کنترل کفایت داده‌ها و اطمینان از نرمال‌بودن داه‌ها، محاسبات آماری داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه توکی (Tukey's W-procedure) توسط نرم افزار R (نسخه R 3.4، پکیج Agricolae Ggplot2) انجام شد. نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار R و OriginPro رسم شد.

نتایج

جدول تجزیه واریانس

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ریزنمونه برای تمامی صفات مورد بررسی معنی‌دار نشد. تأثیر محیط

کشت روی همه صفات در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل ریزنمونه و محیط کشت به‌جز پتانسیل اسمزی محیط کشت برای دیگر صفات شامل زمان القای کالوس، آنتوسیانین، کلروفیل، سرعت رشد القای کالوس و تعداد جنین غیر معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات اندازه گیری‌شده در بررسی کشت بافت پائولونیا

Table 2. Analysis of variance (mean squares) of measured traits in scrutiny Paulownia medium

منبع تغییرات Source of variation	df	زمان القای کالوس Callus induction time (day)	پتانسیل اسمزی محیط کشت Osmotic potential of media (Mpa)	آنتوسیانین Anthocyanin (μ Mol/gr F.w)	کلروفیل Chlorophyll (mg/gr F.w)	سرعت رشد کالوس Callus (cm) growth rate	تعداد جنین Emberyo number
ریزنمونه (a) Explant	1	0.562^{ns}	0.0002^{ns}	0.000001^{ns}	0.0001^{ns}	0.21^{ns}	0.455^{ns}
محیط کشت (b) Medium	7	340.61^{**}	0.033^{**}	0.0536^{**}	1.180^{**}	0.304^{**}	10408.6^{**}
a×b	7	0.133^{ns}	0.0184^{**}	0.000005^{ns}	0.0002^{ns}	0.006^{ns}	1.91848^{ns}
خطای آزمایشی Error	48	1.807	0.0006	0.00002	0.0002	0.037	2.99

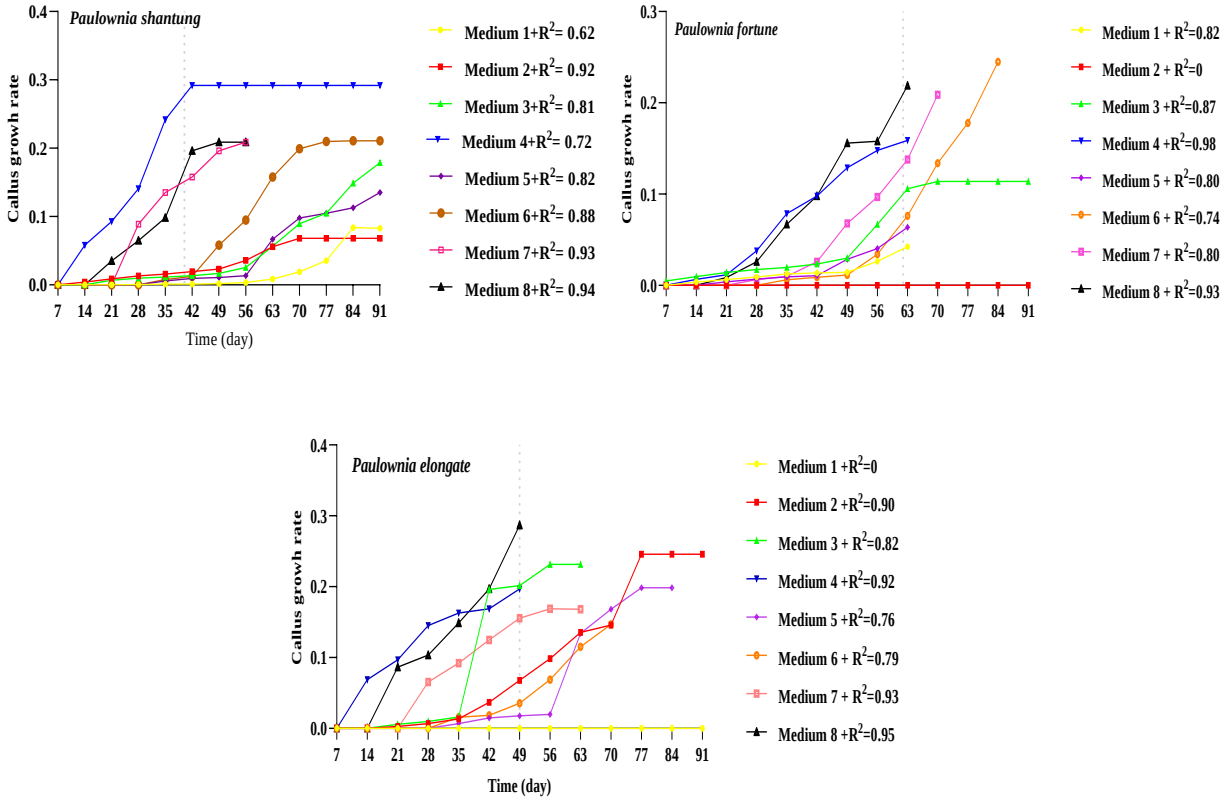
**و ns به‌ترتیب اختالف معنی‌دار در سطح احتمالی ۱ درصد و عدم وجود تفاوت معنی‌دار.

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

سرعت رشد کالوس، القای کالوس و جنین سوماتیکی و تعداد جنین

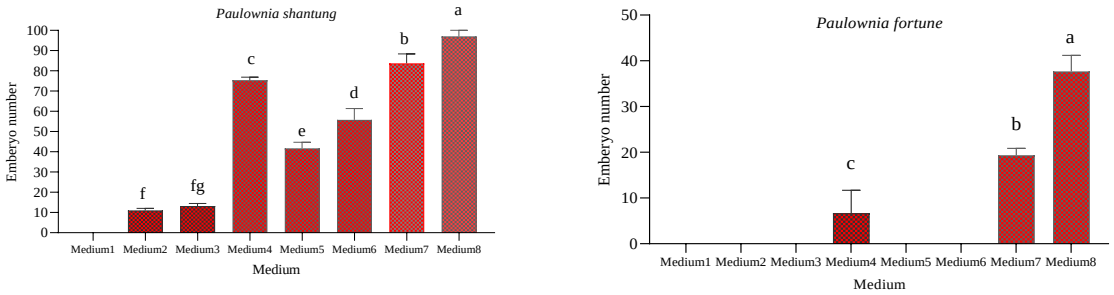
مقدار رشد کالوس‌ها در هر سه گونهٔ مورد بررسی (*Paulownia shantung*، *Paulownia elongata* و *Paulownia fortunei*) با نصف‌شدن نمک‌های معدنی و کاهش غلظت محیط کشت پایه MS نسبت به محیط کشت پایه MS کامل (جدول ۱)، در کمترین زمان به بیشینه مقدار رشد خود رسید و روند کاهشی نشان داد. این امر در محیط کشت ٤ و ۸ نسبت به بقیه محیط‌های کشت بیشتر مشهود است (شکل ۱). براساس نمودار سینتیک رشد در (شکل ۱) مقدار رشد و اندازهٔ کالوس‌ها در محیط کشت‌های پایهٔ MS کامل (محیط کشت‌های ۳ و ۵) روند افزایشی در طی بیشترین زمان نشان داد (شکل ۱). نتایج نشان داد در گونه *Paulownia shantung*، بیشینه مقدار رشد کالوس‌ها در محیط کشت ٤ و ۸ در طی ۲۱ روز اتفاق می‌افتد (شکل a ۱). براساس این پژوهش، بیشترین مقدار رشد کالوس‌ها در گونه *Paulownia fortune* در محیط کشت ٤ در طی ۲۸ روز مشاهده شد و همچنین محیط کشت ۸، ٦ و ۷ به‌ترتیب در طی ٤۹، ۷۰ و ٥٦ روز به بیشترین مقدار رشد رسیدند (شکل b ۱). در گونه *Paulownia elongata*، بیشترین مقدار رشد کالوس‌ها در محیط کشت هشت در طی ٤۲ روز مشاهده شد (شکل c ۱).

این پژوهش نشان داد از میان ۳ گونهٔ مورد پژوهش، گونهٔ *Paulownia shantung* بالاترین تعداد جنین را ایجاد می‌کند (شکل a ۲). با این حال در هر ۳ گونهٔ مورد بررسی، محیط کشت ۸ بیشترین تعداد جنین در بین محیط‌های کشت مورد پژوهش را به‌خود اختصاص داد (شکل ۲). قابل توجه است محیط کشت ۷ بعد از محیط کشت ۸ بیشترین تعداد جنین را داشت.



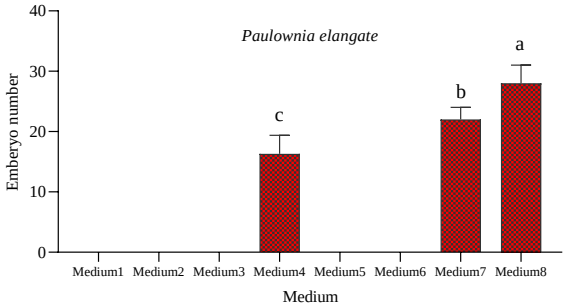
شکل ۱- سرعت رشد کالوس (CGR) بر حسب سانتی‌متر قطر در روز، در طی ۹۱ روز در گونه *Paulownia fortune*، *Paulownia elongata* و *Paulownia shantung* در ۸ نوع محیط کشت مختلف.

Figure 1. Callus growth rate (CGR) in terms of centimeters in diameter per day for 91 days in *Paulownia fortune*, *Paulownia elongata* and *Paulownia shantung* in eight different culture media.



شکل ۲- این شکل تعداد جنین هر گونه مورد بررسی را نشان می‌دهد. بیشترین تعداد جنین در گونه *Paulownia shantung* مشاهده شد (a). با کاهش عناصر درشت مغذی در محیط کشت به ویژه نیترات، تعداد جنین روی محیط‌های کشت افزایش یافت (محیط کشت شماره ٤، ٦، ٧ و ٨).

Figure 2 - This figure shows the number of embryos of each study species. The highest number of embryos was observed in *Paulownia shantung* (a). With the reduction of macronutrients in the culture medium, especially nitrate, the number of embryos on the culture medium increased (culture medium number four, six, seven and eight).



ادامهٔ شکل ۲.

Continued fogure 2.

ضریب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی

واریانس ژنتیکی و فنوتیپی، تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی، وراثت‌پذیری و پیشرفت ژنتیکی به‌عنوان درصدی از میانگین برای صفات مختلف ارزیابی می‌شوند. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بالاترین ضریب تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی برای صفات القای کالوس در گونهٔ *Paulownia shantung* در محیط کشت ۲، ۳ و ۵ مشاهده شده است. این امر برای گونهٔ *Paulownia fortuna* نیز صدق می‌کند (جدول ۲). کمترین ضریب تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی برای صفات القای کالوس روی گونهٔ *Paulownia shantung* و *Paulownia fortuna* در محیط‌های کشت که با کاهش ٤ برابر عناصر درشت مغذی و نصف شدن محیط کشت MS همراه بود، مشاهده شد (به‌ویژه محیط کشت ٦، ۷ و ۸).

اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت

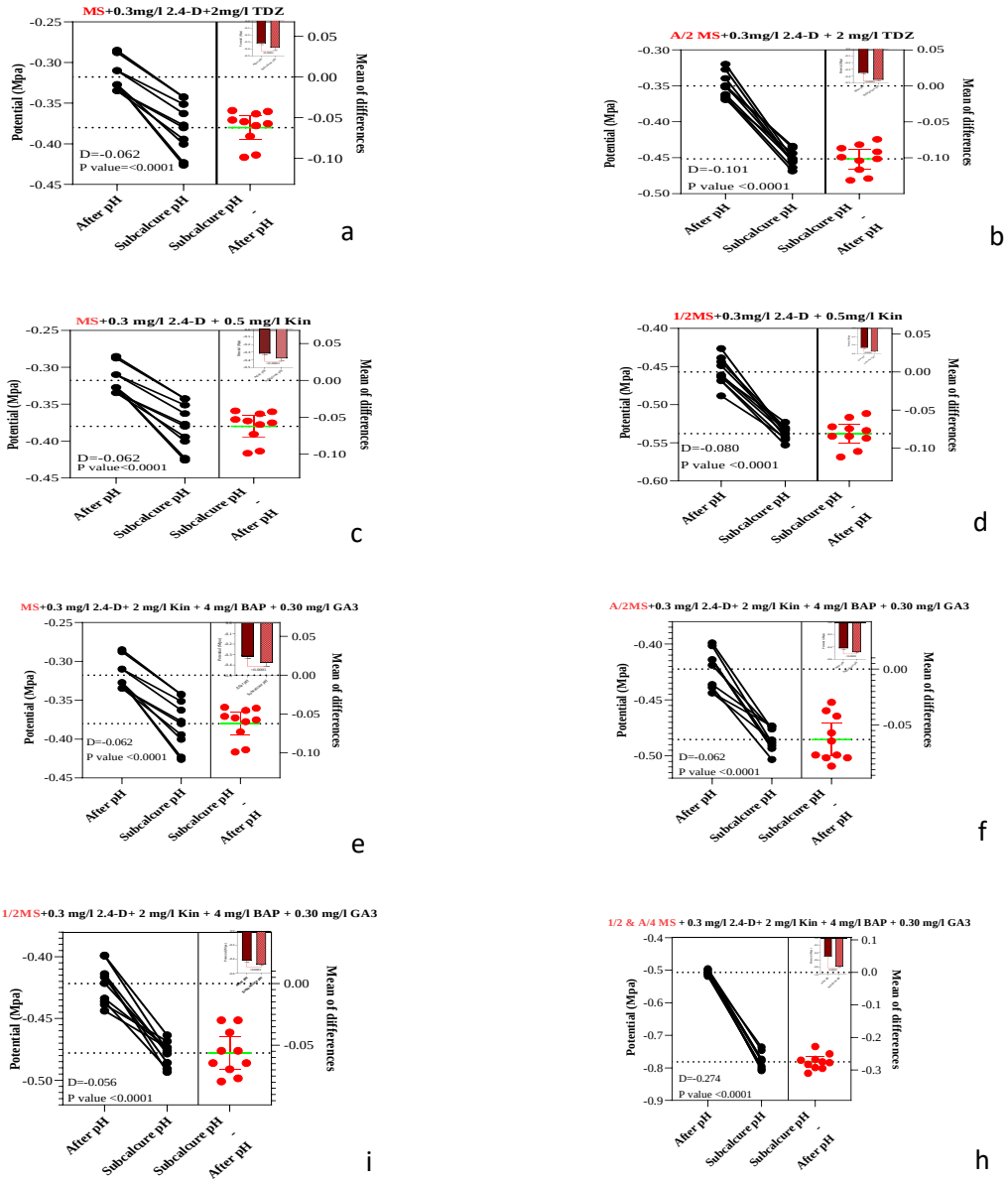
نتایج نشان داد تغییر پتانسیل اسمزی قبل و بعد از واکشت کردن ریزنمونه‌ها (بعد از ٢٤ روز) در محیط کشت ۱ (محیط کشت پایه MS کامل)، از نظر آماری معنی‌داراست. شایان ذکر است در محیط کشت ۲، با نصف شدن عناصر درشت‌مغذی در محیط کشت، اختلاف پتانسیل اسمزی نسبت به محیط کشت ۱ (۰/۱۰۱- مگاپاسگال)، افزایش داشت(شکل a و b ۳).

این بررسی نشان داد محیط کشت ٤ (نصف‌شدن محیط کشت پایه MS)، نسبت به محیط کشت ۳ (محیط کشت پایه MS کامل) بیشترین اختلاف پتانسیل اسمزی، را نشان داد (شکل c و d ۳). پتانسیل اسمزی محیط کشت ۵ و ٦ سرنوشت مشابهی با محیط کشت ۳ و ٤ داشتند (شکل e و f ۳). اختلاف معنی‌داری بین پتانسیل اسمزی محیط کشت ۷ (نصف شدن محیط کشت پایه MS) و محیط کشت ۸ (نصف شدن محیط کشت پایه MS و با مقدار ٤ برابر کاهش نمک‌های معدنی (A/4) در محیط کشت) مشاهده شد. شایان ذکر است پتانسیل اسمزی محیط کشت ۸، بیشترین اختلاف را بین محیط‌های کشت داشت (شکل h ۳). بطور کلی می‌توان گفت در محیط کشت‌هایی که نمک‌های معدنی نسبت به محیط کشت‌های MS کامل، کاهش پیدا کرده است، پتانسیل اسمزی در آن‌ها افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری بین دو مرحلهٔ اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی مشاهده شد.

جدول ۲- اجزاء واریانس محیطی، ژنوتیپی، فنوتیپی، وراثت پذیری و سودژنتیکی صفات القای کالوس برای هر سه گونه مورد بررسی

Table 2 - Components of environmental variance, genotypic, phenotypic, heritability and Genetic gain callus induction traits for all three species studied

G_A	H	ECV	GCV	PCV	Vp	Vg	MSe	MSm	گونه‌های مورد بررسی Studied species	محیط کشت Culture media
0	0	0	0	0	0	0	0	0	*Paulownia shantung*	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	*Paulownia fortuna*	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	*Paulownia elongata*	
81.37	0.88	39.03	110.27	116.97	1976	1756	220	9000	*Paulownia shantung*	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	*Paulownia fortune*	2
0.20	0.01	33.79	4.30	34.06	37.6	0.6	37	40	*Paulownia elongata*	
81.89	0.89	20.20	59.93	63.24	1960	1760	200	9000	*Paulownia shantung*	
11.28	0.51	1290.9	129.09	182.57	120	60	60	360	*Paulownia fortunei*	3
0.67	0.08	18.50	5.61	19.33	14.96	1.26	13.7	20	*Paulownia elongata*	
46.32	081	14.42	30.36	33.61	760	620	140	3240	*Paulownia shantung*	
23.32	0.69	34.40	52.17	62.49	264	184	80	1000	*Paulownia fortunei*	4
2.33	0.10	31.25	10.82	3307	112	12	100	160	*Paulownia elongata*	
37.31	0.86	16.83	42.37	45.60	440	380	60	1960	*Paulownia shantung*	
4.60	0.25	193.64	111.80	223.60	80	20	60	160	*Paulownia fortunei*	5
0.20	0.01	33.79	4.30	34.30	37.6	0.6	37	40	*Paulownia elongata*	
17.36	0.41	38.40	32.57	50.36	405.8	169.8	236	1085	*Paulownia shantung*	
0.89	0.11	17.32	6.32	18.43	13.6	1.6	12.6	20	*Paulownia fortunei*	6
3.1	0.41	7.85	6.57	10.24	13.6	5.6	8	36	*Paulownia elongata*	
11.28	0.5	10.46	10.46	14.80	120	60	60	360	*Paulownia shantung*	
11.28	0.5	22.78	22.78	32.21	120	60	60	360	*Paulownia fortunei*	7
2.33	0.1	20.83	7.21	22.04	112	12	100	160	*Paulownia elongata*	
19.54	0.75	12.16	21.06	24.32	160	120	40	640	*Paulownia shantung*	
14.31	0.46	27.38	25.49	37.41	224	104	120	640	*Paulownia fortunei*	8
3.05	0.36	3.39	2.59	4.27	16.16	5.96	10.2	40	*Paulownia elongata*	



شکل ۳- پتانسیل اسمزی محیط کشت، بعد pH و هنگام واکشت از محیط‌های کشت در هر ۳ گونه مورد بررسی *Paulownia elongata*، *Paulownia fortunei* و *Paulownia shantung*. نمودار میله‌ای و معکوس داخل نمودارها، نشانگر اختلاف بین محیط کشت در دو مرحله اندازه‌گیری پتانسیل اسمزی بعد pH محیط کشت و هنگام واکشت است. نقطه‌های قرمز، پراکندگی و اختلاف میانگین پتانسیل اسمزی هر محیط کشت را نشان می‌دهد.

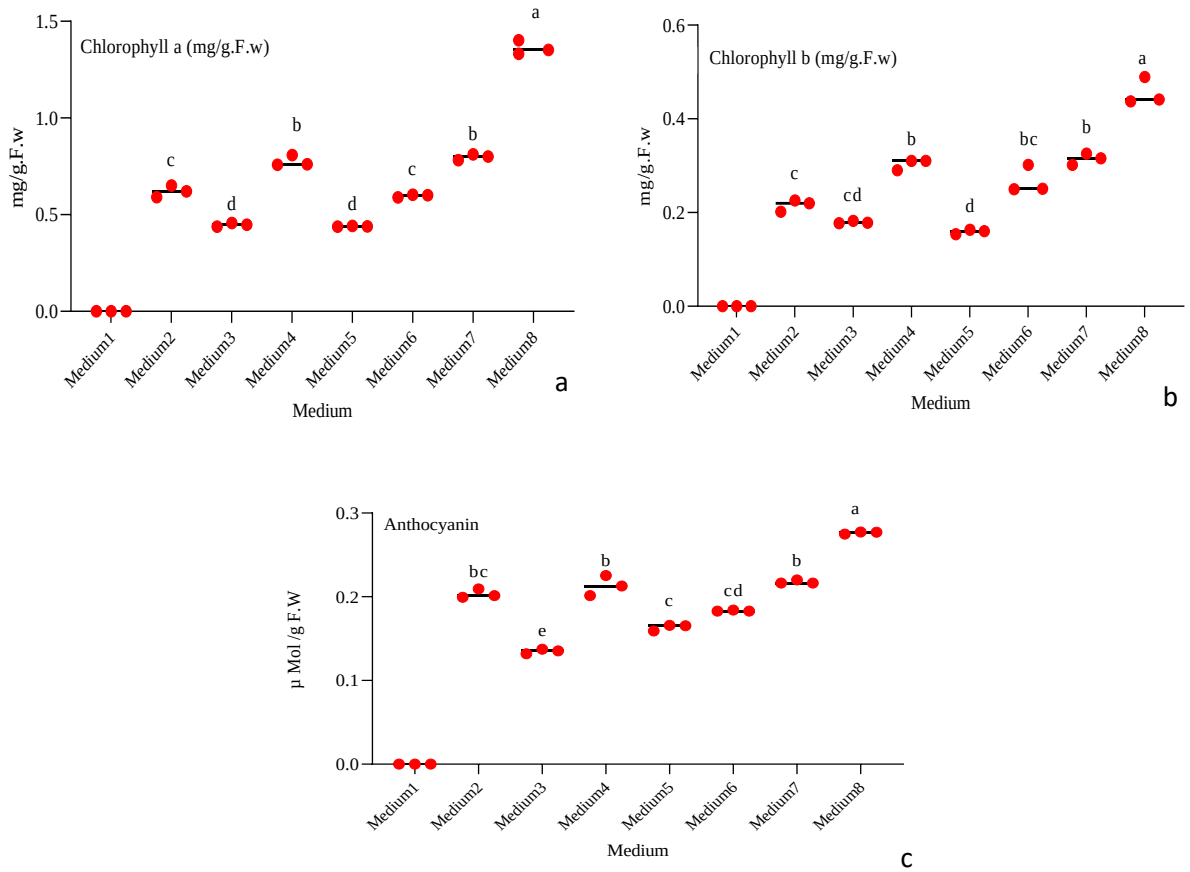
Figure 3. Osmotic potential of culture medium, pH dimension and when subculture culture media in all three studied species *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* and *Paulownia shantung*. The bar and inverted diagrams inside the diagrams show the difference between the culture medium in the two stages of measuring the osmotic potential after the pH of the culture medium and subculture. The red dots indicate the scatter and the difference in the mean osmotic potential of each culture medium.

بررسی مقدار کلروفیل و آنتوسیانین

این پژوهش نشان داد نمونه‌های به‌دست‌آمده در محیط کشت ۸ بین محیط‌های مورد بررسی بالاترین مقدار آنتوسیانین را دارا هستند (شکل c ٤). از سوی دیگر گیاهچه‌های باززاشده در این محیط‌های کشت (عناصر درشت و ریزمغذی کاهش یافت) از رنگدانه‌های

بالایی برخوردار بودند؛ این امر بیشتر در مورد محیط کشت ۸ مشهود است (شکل ٦ i). در محیط‌هایی که عناصر معدنی به‌ویژه آمونیوم کاهش پیدا کرده است (محیط کشت ۲، ٤، ٦، ۷ و ۸) شاهد افزایش محتوای آنتوسیانین (یکی از انواع آنتی اکسیدانت‌ها) بوده‌ایم (شکل ٤ c). در محیط‌های MS کامل، بیشتر کالوس‌ها قهوه‌ای و از بین رفتند. همچنین جنین‌ها در مرحله قلبی شکل متوقف و از رنگ زرد یا سفید شیری به رنگ سفید برفکی تغییر کردند (شکل ٦ h و j).

محتوای کلروفیل a و کلروفیل b در محیط کشت‌هایی که حاوی یک دوم یا یک چهارم عناصر درشت مغذی بودند افزایش یافت (شکل ٤ a). در این محیط‌های کشت رنگ‌دانه‌های بسیار بالایی بر روی برگ‌ها و گیاهچه‌های باززا شده مشاهده شد. بین محیط‌های مورد بررسی، محیط کشت ۸ بالاترین مقدار کلروفیل را به‌خود اختصاص داد (شکل ٦ i).



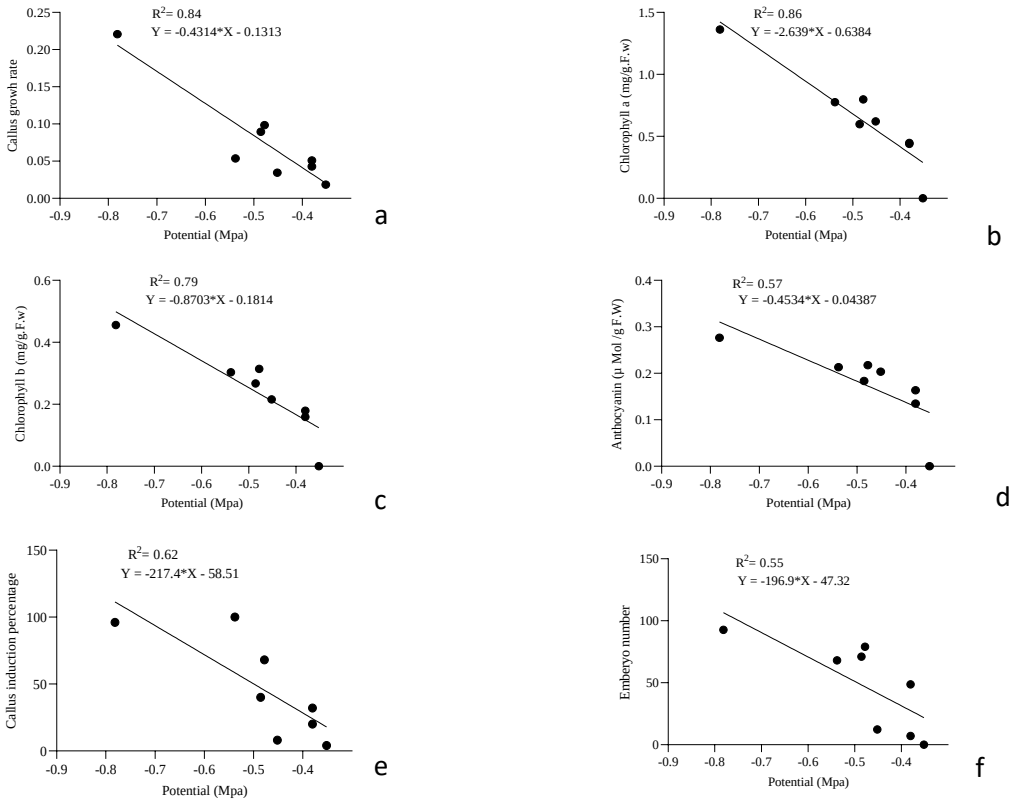
شکل ٤- مقدار کلروفیل و آنتوسیانین برای گونه *Paulownia shantung* در محیط‌های مختلف کشت. حروف لاتین غیر مشترک روی خط میانگین محیط‌های کشت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین محیط‌های مختلف کشت است. نقطه‌های قرمز اختلاف میانگین پراکندگی تکرار محیط‌های کشت است.

Figure 4 - Chlorophyll and anthocyanin levels for *Paulownia shantung* in different media. Non-common Latin letters on the median line of culture media indicate a significant difference between different culture media. Red points are the difference in the mean dispersion of the culture media.

ضرایب همبستگی پتانسیل اسمزی

بررسی مقادیر ضرایب همبستگی پتانسیل اسمزی (بر اساس میانگین صفات در محیط‌های کشت) در شکل

۵ نشان می‌دهد پتانسیل اسمزی با سرعت رشد کالوس رابطه منفی (Y = -0.4313X - 0.1313 و R2 = 0.84) دارد (شکل a ۵). بین محیط‌های مورد بررسی محیط کشت ۸ بالاترین پتانسیل اسمزی را داراست و در این محیط کشت، سلول‌های در حال رشد در کمترین زمان به بیشینه رشد خود می‌رسند. شایان ذکر است که در این محیط کشت تمام کالوس‌ها و جنین‌های باززا شده سالم و بدون هیچ بازدارندگی در کمترین زمان به بیشینه رشد خود رسیدند. پتانسیل اسمزی با کلروفیل a ، b، آنتوسیانین، درصد القای کالوس و تعداد جنین رابطه منفی داشت. همچنین، در محیط‌های کشتی که عناصر درشت مغذی و ریزمغذی به‌ویژه منابع نیترات کاهش یافته است، پتانسیل اسمزی افزایش یافت. باید اشاره کرد در این محیط‌ها بالاترین درصد القای کالوس، جنین‌سوماتیکی و باززایی مشاهده شد (شکل ۵).

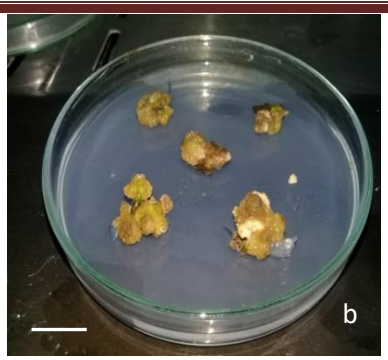


شکل ۵- رابطه رگرسیون خطی پتانسیل اسمزی با صفات مورد پژوهش.

Figure 5 - The relationship between linear regression of osmotic potential and the studied traits.

کالوس جنین‌ها بر روی محیط کشت ٤

Embryo callus on culture medium 4

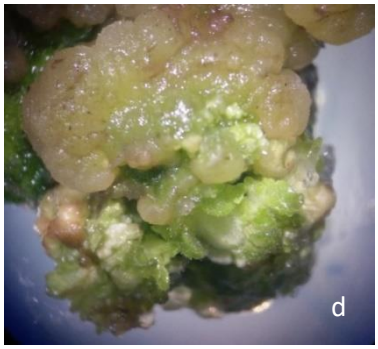


کالوس جنین‌زا بر روی محیط کشت ۸

Embryo callus on culture medium 8

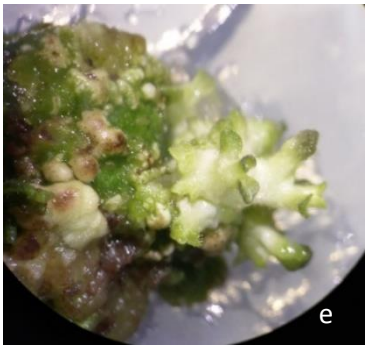
کالوس جنین‌زا بر روی محیط کشت ۸ قبل از مرحله کوتیلیدونی شکل

Embryonic callus on culture medium 8 before the cotyledonary stage



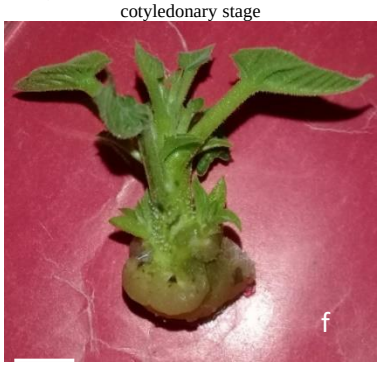
باززایی جنین‌ها در مرحله کوتیلیدونی

Embryonic regeneration in the cotyledonary stage



باززایی کامل جنین‌ها در مرحله دو برگی

Complete regeneration of embryos in the two-leaf stage

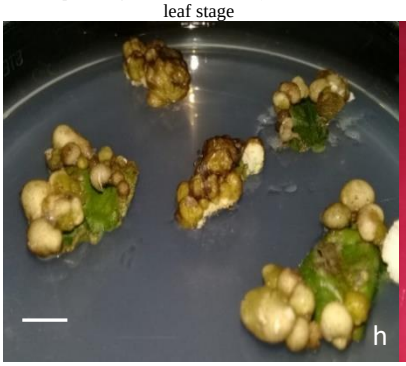


کالوس باززا شده بر روی محیط کشت ۷

Callus regenerated on culture medium 7

کالوس غیر جنین‌زا بر روی کشت ۳ و ۵

Non-embryonic callus on culture medium 3 and 5



متوقف شدن جنین‌ها در مرحله قلبی شکل بر روی محیط ۵ و ۳

embryos stop in the heart-shaped stage on culture medium 5 and 3

باززایی گیاهچه‌های کامل از جنین‌ها بر روی محیط ۸

Regeneration of complete seedlings from embryos on the culture medium 8

گیاهچه‌ها در حال سازگاری

Seedlings are adapting

انتقال گیاهچه‌های سازگار یافته به گلدان‌های کشت

Transfer of adapted seedlings to culture pots

گیاهچه‌های سازگار یافته در گلخانه

Compatible seedlings in the greenhouse

شکل ٦- مراحل مختلف القای کالوس، جنین‌سوماتیکی و باززایی بر روی محیط‌های مورد بررسی.

Figure 6- Different stages of callus induction, somatic embryo and regeneration on the studied environments.

بحث

تأثیر کاهش نیترات بر القای جنین سوماتیکی و باززایی برای بهبود رشد سلول‌ها در گیاهان به‌ویژه در مقولهٔ کشت درون شیشهٔ درختان، کاملاً نوپا بوده و نیاز به پژوهش‌های گسترده‌تری دارد. در این پژوهش با کاهش نیترات در محیط‌های کشت، تغییرات فیزیکی و شیمیایی اساسی در سلول‌های تمایزیافته، ایجاد شد. Dumani et al. (2020) بررسی روی پینه‌زایی، جنین‌زایی‌سوماتیکی و باززایی *Paulownia shangtung* انجام دادند. بیشترین مقدار باززایی جنین‌های سوماتیکی روی محیط کشت ½&A/4 MS + 0.2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l Kin + 4 mg/l BAP + (0.3 GA3) به‌دست آمد. در محیط کشت‌های مورد استفاده، کالوس‌هایی که روی رگبرگ ریزنمونه‌های برگ جوان به‌دست آمدند توانایی جنین‌زایی نداشتند. طبق بررسی انجام‌شده، کالوس‌هایی که روی برگ مسن و دمبرگ تشکیل شده بودند توانایی جنین‌زایی بالای نشان دادند و این قابلیت در محیط‌های ٤، ٧ و ٨ مشهودتر بود. بافت‌های مختلف یک اندام غلظت متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و عناصر را نشان می‌دهند. گزارش شده که برگ پائولونیا حاوی ۳ درصد نیتروژن است (Woods, 2008) و دلیل اینکه با کاهش منبع نیتروژن القای جنین سوماتیکی و باززایی افزایش می‌یابد، می‌تواند غلظت بالای نیتروژن درون‌زاد و از سوی دیگر کاهش سمیت ناشی از نیترون مازاد در محیط کشت باشد. در محیط کشت ۸ جنین‌ها ساختار و شکل متفاوتی داشتند و با سرعت بسیار بالاتری رشد کردند. این کالوس‌ها که آن‌ها را می‌توان "کالوس‌های جنین‌زای تندرشد" نامید در کمترین زمان به بیشینه رشد خود می‌رسیدند و باززایی گیاهچه‌ها انجام می‌شد. از سوی دیگر محیط کشت هشت بالاترین تعداد جنین را داشت (شکل ۲).

با این حال در محیط‌هایی که محیط کشت MS کامل و عناصر درشت مغذی به ۲ و ٤ برابر کاهش پیدا نکرده بودند درصد القای کالوس، درصد القای جنین سوماتیکی و باززایی کاهش یافت و در این محیط‌ها تعداد جنین‌سوماتیکی به کمترین تعداد رسید (شکل ۲). اطلاعات به‌دست آمده از این بررسی نشان داد در طی ۹۱ روز، رشد آهسته کالوس‌ها در محیط‌های کشت پایه MS کامل، شاید دلیلی بر مقدار رشد کمتر و جذب پایین مواد غذایی کالوس‌ها در محیط کشت و قدرت تمایزیابی پایین کالوس‌ها بود. با وجود روند کاهشی سرعت رشد کالوس در محیط کشت‌های با نصف‌شدن نمک‌های معدنی و کاهش محیط کشت پایهMS (محیط کشت ۲، ٤، ٦، ٧ و ٨)، نسبت به محیط‌های کشت پایه MS کامل (۳ و ۵) می‌توان گفت که شاید سرعت رشد کالوس از پیری زودرس، رشد نامناسب و ناهموار آن جلوگیری می‌کند. همچنین می‌توان گفت جذب مواد غذایی توسط کالوس‌ها در این محیط‌های کشت (به ویژه ٤، ٧ و ٨)، بسیار بالا بوده و این امر سبب سرعت بالای مقدار رشد کالوس‌ها و تشکیل جنین‌های سوماتیکی بود. شایان ذکر است در محیط‌هایی که نمک‌های معدنی در آن‌ها کاهش یافته بود (٤، ٧ و ٨) کالوس برجسته و گره‌مانند که بیشتر جنین‌زا بودند، تولید شد؛ در حالی‌که محیط‌هایی که از MS کامل استفاده شده بود کالوس‌های صاف و بدون آب یا به‌شدت آبدار، که به‌ندرت جنین‌زا بودند، تشکیل شد. در واقع در محیط‌های کشت (٤، ٦، ٧، ٨) نسبت به محیط‌های MS کامل به‌دلیل سهولت و سرعت جذب مواد غذایی، کالوس‌ها و جنین‌های سوماتیکی به‌سرعت تشکیل شده و رشد می‌کنند. این امر احتمالا بیشتر می‌تواند به‌دلیل افزایش یا کاهش منبع نیتروژن (آمونیوم) در محیط‌های کشت باشد (de Paiva and

Otoni, 2003). در محیط کشت‌های ٦، ٧ و ٨ با کاهش عناصر درشت مغذی و نصف شدن محیط کشت MS روند افزایش القای کالوس‌زایی، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی مشاهده شد (شکل ١). طبق بررسی Bao et al. (2012) روی گیاه *Rosa hybrida* مشخص شده است بیشترین باززایی و تشکیل جنین سوماتیکی در محیط کشت MS ½ همراه با ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تیدیازورون و 6- بنزیل آدنین بوده است، در حالی‌که محیط کشت MS کامل درصد باززایی و القای جنین سوماتیکی را کاهش داده است. در این بررسی، بیشتر جنین‌های سوماتیکی تشکیل شده در محیط کشت پایه MS ½ و محیط کشت با کاهش ٢ و ٤ برابری عناصر درشت مغذی حفظ شدند و تقریباً هیچ‌گونه نقصی در این محیط‌های کشت مشاهده نشد. همچنین در این محیط‌ها مرحله‌های کروی، قلبی و اژدری شکل به‌راحتی قابل رویت بود. این امر بیشتر برای محیط کشت ٨ مشهود است (شکل a-e ٦). سلول‌های جنین‌زا در این محیط‌های کشت در کمترین زمان به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم مشاهده شدند که این امر در محیط کشت ٨ مشهودتر بود. با این حال، در محیط‌های کشت MS کامل، القای کالوس به سختی مشاهده شد و القای جنین سوماتیکی به‌صورت غیرمستقیم انجام شد. همچنین بیشتر جنین‌ها در این محیط‌های کشت از بین رفتند یا در مرحله قلبی شکل متوقف شدند. انتقال کالوس‌ها از محیط کشت پایه MS کامل به محیط کشت MS ½&A/4 (کاهش ٤ برابر عناصر درشت مغذی و نصف شدن محیط کشت MS)، سبب شده کالوس‌ها به فرم جنین‌زا تغییر پیدا کرده و رشد جنین‌های سوماتیکی در کمترین زمان انجام شود. می‌توان گفت غلظت عناصر درشت مغذی (آمونیوم) اثر قابل توجهی بر درصد القای کالوس، درصد جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی داشت. Chen et al. (2010) گزارش کردند دو محیط کشت MS ½ و ¼ MS به‌طور معنی‌داری بر القای جنین‌زایی سوماتیکی تأثیر نمی‌گذارد، اما تأثیر قابل‌توجهی بر باززایی گیاهچه‌ها دارد. با ظهور گیاهچه‌ها در محیط کشت ٢ و ٣ در محل اتصال گیاهچه به ریزنمونه یک توده سفید برفکی در داخل گیاهچه‌ها شروع به فعالیت می‌کرد که سبب پاره‌شدن پوستهٔ بیرونی گیاهچه‌ها و ازبین‌رفتن آن‌ها می‌شد؛ حتی در بعضی از کالوس‌ها یا جنین‌ها هنگام باززایی در آن‌ها توده سفید رنگی شروع به فعالیت می‌کرد و سبب مهار شدن باززایی گیاهچه‌ها می‌شد.این پدیده روی هر ٢ ریزنمونه دمبرگ و برگ مشاهده شد (شکل j ٦). این امر تا حدودی در مورد محیط کشت ٥ هم صادق است. گیاهچه‌های باززاشده در محیط کشت‌هایی که عناصر درشت مغذی به یک دوم و یک چهارم برابر کاهش پیدا کرده بود معمولا حاوی برگ‌های پهنی بود و رنگ‌دانه‌های بسیار بالایی داشت. همچنین برگ‌ها جوان و شاد بودند و این امر در مورد محیط کشت ٨ مشهودتر است (شکل i و k ٦). گیاهچه‌های باززاشده در محیط کشت ٥ و ٣ حاوی برگ‌های تقریباً بیضی شکل بودند و برگ‌ها از سبزینه کمی برخوردار بودند. باید اشاره کرد بافت‌های مختلف حاوی غلظت متفاوتی از سایتوکنین است. دلیل احتمالی آن می‌تواند سیگنالینگ تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سایتوکنین باشد که در فیلوتاکسی (Phyllotexy) برگ‌ها نقش دارد (Skalák et al., 2019). دلیل اینکه شکل برگ‌ها و دمبرگ‌ها در محیط کشت ٥ و ٣ تغییر کرده است، تغییر در هموستازی سایتوکنین بوده است و این تغییر احتمالا دارد به‌دلیل بالا بودن آمونیوم در محیط کشت باشد. به‌طور کلی شاید بتوان گفت در محیط کشت‌های MS کامل نمک‌های معدنی، مانند نیترات به

آمونیوم تبدیل شده و سبب تولید اتیلن در محیط کشت و افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد شده است. ماده فنولی در واکوئل سلول‌ها قرار دارد و چون ریزنمونه‌ها به اندازه دیسک‌های یک سانتی‌متری تهیه شده بودند از مکان‌های برشی، تراوش ماده فنولی به محیط کشت افزایش یافت. این مساله سبب افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و قهوه‌ای شدن بافت، از بین بردن سلول‌های پیش جنینی و ایجاد کلروز و نکروز بالای ریزنمونه‌ها می‌شود. از سوی دیگر اختلال در هموستازی سایتوکنین رخ خواهد داد. بررسی دیگر پژوهشگران نشان داد که دستکاری سطح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سایتوکنین منجر به لوله‌شدن برگ‌ها و همچنین مورفوژنز (morphogenetic) برگ‌های در گیاه گوجه فرنگی می‌شود (Shani et al., 2010). این پدیده می‌تواند سبب اختلال جذب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، جذب مواد غذایی و ایجاد تأثیرات منفی و مخرب در ریزنمونه‌های کشت‌شده و همچنین گیاهان باززاشده شود (Bosak et al., 2019). در این بررسی، دریافتیم که کاهش ۲ یا ٤ برابری نیتروژن بر ریزنمونه‌های کشت شده مؤثر بوده و بر القای جنین‌زایی سوماتیکی مفید است. نتایج نشان داد درصد القای کالوس وجنین سوماتیکی در محیط کشت ۱ به صفر رسید به‌همین دلیل در نمودارها نشان داده نشده است. القای جنین سوماتیکی به هر دو فرم مستقیم و غیرمستیم در محیط کشت ۸ در کمترین زمان انجام شد و کالوس‌ها و جنین‌هایی که در محیط ۸ القا شده بودند سلول‌های کشیده‌تری داشتند. همچین زمان القای جنین سوماتیکی در محیط‌هایی که عناصر معدنی در آن‌ها به یک دوم و یک چهارم برابر کاهش یافت در مقایسه با محیط‌های MS کامل کاهش یافت (شکل a و ٦ b). شاید دلیل این تفاوت‌ها بین محیط‌های کشت، به‌دلیل حفظ تعادل pH در محیط‌هایی که در آن عناصر درشت‌مغذی کاهش یافت است، باشد و همچنین عدم تعادل pH در محیط‌های MS کامل باشد. حفظ تعادل یا عدم تعادل pH محیط کشت به مقدار غلظت آمونیوم در محیط کشت برمی‌گردد. وجود آمونیوم در محیط کشت، سبب عدم تعادل pH محیط کشت می‌شود (Chen et al., 2010). علاوه بر نور و دما عوامل متعددی مانند تغذیه هم می‌تواند مراحل بیوسنتزی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی اکسین را تحت تأثیر قرار دهد، مثلا اگر نیتروژن جذب شود می‌تواند مراحل بیوسنتزی را محدود کند. می‌توان گفت در محیط‌هایی که عناصر درشت‌مغذی به یک دوم و یک چهارم برابر کاهش یافت که به دلیل عدم سمیت آمونیوم و حفظ تعادل pH محیط کشت، جذب نیترات سبب فعال‌شدن اسید آمینه تریپتوفان شد و رشد سلول‌ها در کمترین زمان به فعالیت خود ادامه پیدا کرده‌اند. این امر در مورد محیط کشت ۸ مشهودتر است. Romani در سال (2017) اظهار کرد در حضور تنظیم اکسین در سطح غشاء با پذیرنده ABP1 اتصال برقرار می‌کند با فعال شده ABP1، پروتون‌ها از سطح سیتوزل به سمت دیواره سلولی حرکت کرده و سبب اسیدی‌ترشدن دیواره سلولی می‌شود. با اسیدی‌شدن دیواره سلولی کانال‌های پتاسیمی فعال شده، همزمان پتانسیل اسمزی انجام می‌شود. به‌دلیل این امر آب و مواد غذایی به داخل سلول حرکت کرده و از سوی دیگر سبب شل شدن دیواره‌ای سلولی شده در نهایت رشد انجام می‌شود. همچنین طویل شدن سلول‌ها، به‌دلیل جذب اکسین و شل‌شدن دیواره سلولی است. یکی از مزایای کشت بافت در ریزازدیادی همسانی گیاهان باززا شده با پایه مادری است؛ در غیر این صورت از نظر ژنتیکی تنوع سوماکلونال رخ داده که پدیده مطلوبی نیست (Leva et al., 2012). شاید بتوان گفت یکی از علل زیادبودن تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی،

بالا بودن مقدار آمونیوم و نیترات در محیط کشت باشد که سبب ایجاد تغییرات ناخواسته شد. با این تفسیر می‌توان گفت القای کالوس در محیط‌های ۲، ۳ و ۵ نشان‌دهنده تنوع بالا در بین محیط‌های مورد بررسی برای این صفت است، پس می‌توان نتیجه گرفت تنوع ناخواسته یا همان تنوع سوماکلونال با شدت بیشتری در این محیط‌ها رخ داد. در همین حال می‌توان گفت در محیط‌های ٦، ۷ و ۸ تنوع سوماکلونال به کمینه ممکن خود رسیده است. این امر احتمالا به‌دلیل کاهش عناصر درشت مغذی به‌ویژه منابع نیترات در محیط کشت است. ضریب تغییرات فنوتیپی، نشان‌دهندهٔ بخشی از تنوع کلی است اما ضریب تغییرات ژنوتیپی بیان‌کنندهٔ بخشی از تنوع و تغییراتی است که قابل توارث است که سبب افزایش پاسخ به گزینش می‌شود. قابل اطمینان بودن یک متغیر انتخاب‌شده در برنامهٔ القای کالوس و جنین سوماتیکی به اندازهٔ ضریب تغییرات ژنتیکی آن بستگی دارد. ضریب تغییرات ژنوتیپی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی برای صفت بوده و هرچه تنوع در صفت بیشتر باشد انتخاب بر اساس آن‌ها منجر به پاسخ به گزینش بهتری خواهد شد (Moosavi et al., 2014). مقدار وراثت‌پذیری برای یک صفت ویژه بسته به شرایط محیطی، نوع جمعیت مورد بررسی و روش برآورد می‌تواند تغییر کند (Du et al., 2017). در این پژوهش مقدار وراثت‌پذیری به‌جز گونهٔ *Paulownia elongata* بالاتر از ٤١ درصد بود و بالاترین وراثت پذیری و سود ژنتیکی (به‌ترتیب ۸۹ و ۸۱/۸۹ درصد) در گونهٔ *Paulownia shantung* در محیط‌های MS کامل مشاهده شد (جدول ۲). که نشان‌دهندهٔ احتمال تنوع سوماکلونال بالای این صفات در محیط‌های MS کامل است. از سوی دیگر این تنوع به‌راحتی به گیاهچه‌های باززا شده انتقال یافته است. به‌طور کلی احتمالا در محیط کشت‌هایی که حاوی محیط کشت پایه MS کامل هستند، نمک‌های معدنی، مثل نیترات تبدیل آمونیوم شده و سبب تولید اتیلن در محیط کشت‌شده و فعالیت‌های رادیکال‌های آزاد در محیط کشت افزایش یافته است، از سوی دیگر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، در محیط کشت شروع می‌شود. لازم به‌ذکر است ماده فنولی در واکوئل سلول‌ها قرار داشته چون ریزنمونه‌های به اندازه دیسک‌های یک سانتی‌متری تهیه شده بوداند، از مکان‌های برشی، تراوش ماده فنولی در محیط کشت افزایش یافت. می‌توان نتیجه گرفت که در محیط‌های مذکور به‌دلیل افزایش شانس تبدیل نیترات به آمونیوم و تراوش ماده فنولی در محیط‌های کشت توانایی پایین جذب مواد غذایی توسط ریزنمونه‌های کشت شده، شیشه‌ای شدن محیط‌های کشت، آزاد شدن مولکول‌های آب، توانایی پایین جذب ساکارز و آب توسط ریزنمونه‌ها، سبب کاهش کمتر پتانسیل اسمزی در محیط‌های کشت، MS کامل شده است. از سوی دیگر در محیط کشت‌های که نمک‌های معدنی کاهش پیدا کرد. شانس افزایش تبدیل نیترات به آمونیوم کاهش پیدا کرده و احتمال فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در محیط‌های کشت کم می‌شود، آزاد شدن ملکول‌های آب کاهش پیدا کرده، پدیده شیشه‌ای شدن محیط کشت کاهش یافته، توانایی بالای جذب مواد غذایی و آب و ساکارز در محیط کشت، سبب افزایش پتانسیل اسمزی در محیط‌های کشت‌شده است، این امر در مورد محیط کشت ۸ مشهودتر است. در محیط فوق کالوس‌ها و کالوس‌های‌جنین‌زا بدون سوختگی ترد، شفاف، گیاهچه‌های باززاشده شاداب‌تر و در برگ‌های گیاهچه‌ها بیشترین رنگ‌دانه‌ها مشاهده شد. گیاهچه‌ها باززاشده حاوی بیشترین رشد طولی، حاوی بیشترین عرض و طول برگ، تعداد بالای برگ‌ها بر روی

گیاهچه‌ها بود. پس می‌توان گفت در این پژوهش محیط‌های مورد بررسی برای صفات مورد اندازه‌گیری به‌شدت تحت تأثیر پتانسیل اسمزی بوده است و عناصر غذایی به‌ویژه منابع نیترات پتانسیل اسمزی را کنترل می‌کند. بنا به اطلاعات به‌دست‌آمده پژوهشگران کشت بافت و سلول گیاهی در طراحی آزمایش‌های کشت بافتی باید به مقدار عناصرهای درشت‌مغذی و ریزمغذی به‌ویژه منبع نیترات موجود در محیط کشت توجه بیشتری داشته باشند. در پژوهشی دریافتند که بیشترین رشد کالوس در حضور مانیتول یا سوربیتول در پتانسیل 1.290Mpa- تا 1.490 Mpa- انجام می‌شود اما در صورت افزودن ساکارز یا گلوکز، بیشترین رشد کالوس در پتانسیل‌های 1.09 Mpa- تا 1.290 Mpa- انجام شد (George et al,. 2007). بسیاری از سلول‌های کالوس، در محیط کشت استاندارد شکل غیرعادی به‌خود می‌گیرند. با کاهش‌دادن پتانسیل اسمزی محیط کشت، این شکل گیری‌های غیر عادی کمتر می‌شود و در پتانسیل 1.090 Mpa- سلول‌ها کروی شکل به راحتی تشکیل شدند و مرحله جنینی به‌راحتی مشاهده و انجام شد (George et al,. 2007). Wan et al. (2015) نشان دادند ترکیبات آنتوسیانین و مقدار بیان ژن‌های آن‌ها در برگ‌ها و کالوس ارقام گیاه خرچنگ *Malus sp* زمانی که نسبت کربن به نیتروژن افزایش یافت، افزایش پیدا کرد و این اختلاف با گیاه شاهد اختلاف چشم‌گیری داشت. در این بررسی محیط‌هایی که مقدار بالایی از آنتوسیانین را به‌خود اختصاص دادند حاوی کالوس‌ها و جنین‌های زرد و سفید شیری و باززایی سالمی بودند. در این محیط‌ها کالوس و جنین‌ها بدون سوختگی و قهوه‌ای شدن به رشد خود ادامه می‌دادند (شکل a-e ٦). افزایش آنتی‌اکسیدانت در این محیط‌های کشت می‌تواند به‌دلیل عدم وجود سمیت آمونیوم در محیط کشت باشد. با کاهش منبع نیتروژن و جذب بالای کربن (ساکارز) آنتی‌اکسیدانت‌ها افزایش می‌یابند، به‌عبارت دیگر با افزایش نسبت کربن به نیتروژن آنتی‌اکسیدانت افزایش می‌یابد. درحالی‌که در محیط‌های کشت MS کامل مقدار آنتوسیانین کمتر از محیط‌های که عناصر معدنی به‌ویژه آمونیوم کاهش پیدا کرده، است. به‌نظر می‌رسد افزایش آنتوسیانین به رشد سلول‌های اولیه جنین‌زا کمک کرده و ازبین‌رفتن یا مهارشدن آن‌ها در یکی از مرحله‌های جنینی توسط رادیکال‌های آزاد و آنزیم پلی‌فنل اکسیداز جلوگیری کرد. مقدار بالای آنتوسیانین از تجمع رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و با کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز مهار رشد سلول‌ها به کمینه می‌رسد. نتایج بررسی Domínguez et al. (2008) نشان داد با افزایش آمونیوم، آنتی‌اکسیدانت‌ها کاهش پیدا می‌کنند و ازسوی دیگر افزایش رادیکال‌های آزاد در شرایط افزایش مقدار یون آمونیوم انجام می‌شود. در بررسی روی سوسپانسیون سلولی گیاه *Vitis vinifera* مشخص شد یون‌های آمونیوم سبب تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) و درنتیجه سبب اکسیدشدن آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌شود (Skopelitis et al., 2006). محیط کشت ۳ و ۵ مقدار کلروفیل a و b کمتری داشتند (شکل a ٤). یکی از دلایل این امر می‌تواند تشکیل کم رنگ‌دانه‌ها باشد. پس فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در این محیط‌ها کم بود و از سوی دیگر زوال کلروفیل انجام شد. در حالی که گیاهچه‌های که در محیط کشت ۸ به‌دست‌آمده بودند حاوی رنگ‌دانه‌های بالای بودند. شاید دلیل رنگ‌دانه‌های بالا، جذب ساکارز بیشتر نسبت به نیتروژن باشد که سبب فعالیت بالای ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی شده باشد و آنتی‌اکسیدانت‌ها از زوال‌شدن کلروفیل جلوگیری کرده باشند. غلظت کلروفیل در گیاهان زنده یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است

(Jiang and Huang, 2001). امکان دارد زوال کلروفیل در محیط کشت ۳ و ۵ به‌دلیل فعالیت رادیکال‌های آزاد باشد.

نتیجه‌گیری

یکی از موارد تأثیر گذار در القای جنین سوماتیکی و باززایی در کشت بافت، تنظیم کننده‌های رشد و مواد غذایی موجود در محیط کشت است. این پژوهش نشان داد MS کامل اثر زیادی روی پتانسیل اسمزی محیط کشت ندارد. در این محیط‌های کشت، القای کالوس، القای جنین‌سوماتیکی و باززایی کاهش یافت. همچنین در این محیط‌های کشت تنوع سوماکلونال افزایش یافت و بیشتر کالوس‌های القایافته و جنین‌های‌سوماتیکی ازبین رفتند. درهمین حال، در محیط‌هایی که عناصر معدنی به‌ویژه آمونیوم کاهش پیدا کرده است مقدار پتانسیل اسمزی محیط کشت افزایش یافته است اما درصد القای کالوس، جنین‌سوماتیکی، باززایی، محتوای کلروفیل، آنتوسیانین و سرعت بالای القای کالوس در این محیط‌های کشت افزایش یافت. از سوی دیگر تنوع سوماکلونال به‌شدت کاهش یافته است. بنابراین ضروری است پژوهشگران برای اقدام به ریزازدیادی گونه‌های پائولونیا به کاهش عناصر درشت و ریزمغذی به‌ویژه منابع نیترات محیط کشت توجه ویژه‌ای داشته باشند. اسناد علمی زیادی نشان داده است که برای باززایی و ریزازدیادی پائولونیا نیاز به زمان زیادی است، یا حتی در بسیاری از پروتکل‌ها جنین سوماتیکی به‌دلیل نیترات و فنل بالای بافت درونی برگ پائولونیا مشاهده نمی‌شود. نیترات و فنل در محیط کشت درون‌شیشه‌ای مسمومیت ایجاد کرده و القای جنین‌سوماتیکی و باززایی را با مشکل مواجه می‌کند. در نتیجه، این پژوهش با کاهش منابع نیترات موفق به ارایهٔ یک پروتکل موثر و مفید برای القای جنین سوماتیکی، باززایی و افزایش آنتوسیانین در کمترین زمان در محیط کشت شد. شایان ذکر است این بررسی برای اولین بار با استفاده از کاهش منابع نیترات مشکل بازدارندگی القای جنین سوماتیکی و باززایی گونه‌های پائولونیا در شرایط درون‌شیشه‌ای را رفع کرده است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از حمایت مالی دانشکدگان ابوریحان دانشگاه تهران و پارک علم و فناوری دانشگاه تهران (۱۲۰۰۲۱) در انجام این پژوهش قدردانی می‌کنند.

References

Bao, Y.; Liu, G.; Shi, X.; Xing, W.; Ning, G.; Liu, J.; Bao, M., Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in Rosa hybrida 'Samantha'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **2012,** *109* (3), 411-418.

Bosak, H.; Daneshvar, M.; Salehi Salmi, M.; Lotfi Jalal-Abadi, A., In vitro plant regeneration through direct organogenesis in Cordia myxa L. *Forest Research and Development* **2019,** *5* (4), 657-672. (In Persian)

Chen, A. H.; Yang, J. L.; Niu, Y. D.; Yang, C. P.; Liu, G. F.; Yu, C. Y.; Li, C. H., High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of Schisandra chinensis and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA3, and BA on somatic embryo development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **2010,** *102* (3), 357-364.

Clapa, D.; Fira, A.; Simu, M.; Vasu, L. B.; Buduroi, D., Improved in vitro propagation of Paulownia elongata, P. fortuneii and its interspecific hybrid P. elongata x P. fortuneii. *Bulletin UASVM Horticulture* **2014,** *71* (1), 6-14.

de Paiva Neto, V. B.; Otoni, W. C., Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae* **2003,** *97* (3-4), 193-202.

Domínguez-Valdivia, M. D.; Aparicio-Tejo, P. M.; Lamsfus, C.; Cruz, C.; Martins-Loução, M. A.; Moran, J. F., Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-

tolerant and-sensitive plants. *Physiologia Plantarum* **2008,** *132* (3), 359-369.

Du, Y.-p.; Bi, Y.; Zhang, M.-f.; Yang, F.-p.; Jia, G.-x.; Zhang, X.-h., Genome size diversity in Lilium (Liliaceae) is correlated with karyotype and environmental traits. *Frontiers in plant science* **2017,** *8*, 1303.

Dumani, Y.; Mortazavian, S. M. M.; Izadi-Darbandi, A.; Ramshini, H.; Bahmankar, M., The Study of effective factors in callus induction, somatic vegetative and regeneration in Paulownia ShanTong. *Forest Research and Development* **2020,** *6* (2), 347-366. (In Persian)

George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G. J., Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. The Background. Exegetic Basingstone: 2007**.**

Jain, S. M.; Gupta, P. K., *Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants*. Springer: 2018.

Jiang, Y.; Huang, B., Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop science* **2001,** *41* (2), 436-442.

Leva, A.; Petruccelli, R.; Rinaldi, L., Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. *Recent advances in plant in vitro culture* **2012,** *7*, 123-150.

Lichtenthaler, H. K., [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 1987; Vol. 148, pp 350-382.

Moosavi, S.; Jalalifar, S.; Abdollahi, M. R.; Chaichi, M., Evaluation of diversity and heritability of some morphological traits in bread wheat under stress and normal conditions. *Daneshe Zeraat* **2014,** *5* (9), 37-54.

Ramarosandratana, A.; Harvengt, L.; Bouvet, A.; Calvayrac, R.; Pâques, M., Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **2001,** *37* (1), 29-34.

Romani, F., Origin of TAA genes in charophytes: new insights into the controversy over the origin of auxin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **2017,** *8*, 1616.

Shani, E.; Ben-Gera, H.; Shleizer-Burko, S.; Burko, Y.; Weiss, D.; Ori, N., Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. *The Plant Cell* **2010,** *22* (10), 3206-3217.

Shi, X.; Dai, X.; Liu, G.; Bao, M., Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (Cinnamomum camphora L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. *Trees* **2009,** *23* (5), 1033-1042.

Skalák, J.; Vercruyssen, L.; Claeys, H.; Hradilová, J.; Černý, M.; Novák, O.; Plačková, L.; Saiz-Fernández, I.; Skaláková, P.; Coppens, F., Multifaceted activity of cytokinin in leaf development shapes its size and structure in Arabidopsis. *The Plant Journal* **2019,** *97* (5), 805-824.

Skopelitis, D. S.; Paranychianakis, N. V.; Paschalidis, K. A.; Pliakonis, E. D.; Delis, I. D.; Yakoumakis, D. I.; Kouvarakis, A.; Papadakis, A. K.; Stephanou, E. G.; Roubelakis-Angelakis, K. A., Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell* **2006,** *18* (10), 2767-2781.

Wagner, G. J., Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology* **1979,** *64* (1), 88-93.

Wan, H.; Zhang, J.; Song, T.; Tian, J.; Yao, Y., Promotion of flavonoid biosynthesis in leaves and calli of ornamental crabapple (Malus sp.) by high carbon to nitrogen ratios. *Frontiers in plant science* **2015,** *6*, 673.

Woods, V., *Paulownia as a novel biomass crop for Northern Ireland?: a review of current knowledge*. Agri-Food and Biosciences Institute, Global Research Unit: 2008.

Yadav, N. K.; Vaidya, B. N.; Henderson, K.; Lee, J. F.; Stewart, W. M.; Dhekney, S. A.; Joshee, N., A review of Paulownia biotechnology: a short rotation, fast growing multipurpose bioenergy tree. *American Journal of Plant Sciences* **2013,** *4* (11), 2070.

Zuazo, V. H. D.; Torres, F. P.; Pleguezuelo, C. R. R., Biomass yield potential of paulownia trees in a semi-arid Mediterranean environment (S Spain). *International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)* **2013,** *3* (4), 789-793.

Interaction of nutrients, pH and osmotic potential of culture medium on calli induction and embryogenesis of Paulownia tree in vitro

Y. Dumani[1], S. M. M. Mortazavian[*2], A. Izadi Darbandi[3] and H. Ramshini[4]

1- M.Sc. of Genetics & Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, I. R. Iran. (yassin.dumani@ut.ac.ir)
2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, I. R. Iran. (mortazavian@ut.ac.ir).
3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, I. R. Iran. (aizady@ut.ac. ir)
4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, I. R. Iran. (ramshini_h@ut.ac.ir)

Received: 02.09.2021 Accepted: 08.12.2021

Abstract

Paulownia is a fast-growing, industrial and ornamental tree with medicinal properties. The present study was performed to investigate the osmotic potential of MS basal culture medium under the effect of macronutrients and micronutrients. Also, the effect of osmotic potential on callus induction, somatic embryo, regeneration, antioxidant activity and somaclonal variation were investigated. The present experiment was carried out factorial in a completely randomized design with two factors, explants (leaves and petioles) and eight types of culture media containing different combinations of culture medium elements with different combinations of plant growth regulators (PGR). The results showed that the highest level of callus induction, somatic embryogenesis and regeneration were observed in media with one-half and one-quarter times the macronutrients of MS culture medium. Anthocyanin activity, chlorophyll content, embryo number and osmotic potential increased with decreasing macronutrients, especially nitrate sources in culture medium. However, callus growth rate and somaclonal variation decreased. In culture medium, calluses and embryogenic calluses without burns, transparent, regenerated seedlings were more vibrant and the most pigments were observed in the leaves of seedlings. In complete MS media, callus induction, somatic embryo, osmotic potential, anthocyanin, chlorophyll decreased. While callus growth rate and somaclonal variation increased.

Keywords: Anthocyanin, Callus induction, Somatic embryo, Somaclonal variation, Osmotic potential.

[*] Corresponding author Tel: +989126788738