تکثیر درون شیشه‌ای پامچال (*Primula acaulis* L.) با استفاده از ریزنمونه‌های نوک شاخساره

In Vitro Propagation of Primrose (*Primula Acaulis* L.), Via Shoot Tip Explants

علی‌رضا نوروزی‌شرف[۱]، منصور غلامی[۲*]، یوسف حمیداوغلی[۳] و هدایت زکی‌زاده[۳]

چکیده

این مطالعه بر روی پامچال (*Primula acaulis*) انجام گرفت. هدف از این پژوهش استقرار و ایجاد پروتکلی قابل تکرار برای تولید و تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه از نوک شاخساره بود. ابتدا بذرها در محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کشت گردیدند. سپس، نوک شاخساره به دست آمده از دانهال‌های درون شیشه‌ای، در چندین محیط پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف ۶- بنزیل آدنین (BA) و تیدیازورن (TDZ)، در ترکیب با غلظت‌های مختلف ۱- نفتالین استیک اسید (NAA) کشت گردید. این آزمایش به صورت دو طرح جداگانه فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. نتایج نشان داد که درصد پاسخ ریزنمونه‌ها در تیمارهای آزمایش اول، از صفر تا ۱۰۰٪ و در تیمارهای آزمایش دوم، از ۳۰ تا ۱۰۰٪ متغیر بود. محیط‌های کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA در تیمارهای آزمایش اول و محیط‌های حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ در تیمارهای آزمایش دوم، بیش‌ترین شاخساره را تولید کردند. شاخساره‌های باززایی شده به سهولت و بدون نیاز به محیط‌های کشت ریشه‌زایی، ریشه‌دار شدند. بیش‌ترین تعداد ریشه در محیط ۳ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA در تیمارهای آزمایش اول و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA در تیمارهای آزمایش دوم به‌دست آمد. در نهایت گیاهچه‌های سازگار شده به محیط برون شیشه‌ای برای رشد و نمو بیشتر انتقال یافتند.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، باززایی شاخساره، پامچال، تیدیازورون

۱ و ۳. به ترتیب دانشجوی دکتری علوم باغبانی و استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت.

۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

*: نویسنده مسوول

مقدمه

پامچال (*Primula* spp.) گیاهی چند ساله است و گل‌ها در گونه‌های مختلف این جنس از نظر شکل و رنگ بسیار زیبا و متنوع هستند. شرایط زیستی گونه‌ها بسیار متفاوت است، بعضی از آن‌ها ویژه‌ی نواحی کوهستانی و صخره‌ها هستند و برخی دیگر در مرداب و نقاط مرطوب و برخی هم در مناطق جنگلی می‌رویند (Sanei Shariatpanahi 2009). یکی از گونه‌های تجاری و اصلاح شده‌ی پامچال *P. acaulis* است، که همانند اکثر گونه‌های پامچال در اواخر اسفند و اوایل بهار گل می‌دهند. لذا گلدهی خارج از فصل در این گیاه مزیت نسبی را به‌وجود آورده است. بذرهای پامچال گران بوده و قوه‌ی نامیه‌ی خود را به سرعت از دست می‌دهند. هم‌چنین بی‌نظمی و تاخیر در جوانه‌زنی بذر در اکثر گونه‌های پامچال مانع جدی برای افزایش انبوه این گیاهان است (Coumans *et al*. 1979 and Morozowska & Wesołowska 2004). لذا با کشت درون شیشه‌ای می‌توان در مدت زمان کم تعداد قابل توجهی از این گیاه را تولید کرد. ریزازدیادی برخی گونه‌های پامچال قبلا گزارش شده است. شاخسارهای نابه‌جا در گونه‌ی *P. obconica* با استفاده از جوانه‌های گل در محیط‌های کشت حاوی بنزیل آدنین (BA) و نفتاالین استیک اسید (NAA) بازرا شدند (Coumans *et al*. 1979). رویان‌های بدنی و شاخساره‌های نابه‌جا با کشت قطعات برگ *P. cuneifolia* var. hakusanensis در محیط کشت حاوی تیدیازورون (TDZ) به‌دست آمدند (Shimada *et al*. 1997). برگ‌های جوان توسعه یافته‌ی *P. sieboldii* در محیط کشت حاوی BAو NAA بازرا گردیدند (Yamamoto *et al*. 1999). هیبریدهای سوماتیکی بین *P. malacoides* و *P. obconica* به‌طور موفقیت آمیزی با کشت سوسپانسیون سلولی حاصل گردیدند (Mizuhiro *et al*. 2001b). تولید کالوس از قطعات برگ *P. elatior* و *P. vulgaris* در غلظت‌های بالای TDZ القا گردید (Schween & Schwenkel 2002 & 2003). ازدیاد کلونی *P. veris* با استفاده از ریزنمونه‌های نوک شاخساره صورت گرفته است (Morozowska & Wesołowska 2004 and Okršlar *et al*. 2007). اخیراً، اثرات سیتوکینین‌های مختلف (BA، TDZ و کاینتین) بر روی باززایی شاخساره‌های نابه‌جا از ریز نمونه‌های برگ پامچال زرد (*Primula* × *pubescens* Jacq.) بررسی شده است (Takihira *et al*. 2007).

هدف از این پژوهش استقرار و ایجاد پروتکلی قابل تکرار برای تولید و تکثیر درون شیشه‌ای پامچال (*Primula acaulis*) از نوک شاخساره با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد مختلف (BA، TDZ و NAA) است.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت

محیط پایه مورد استفاده در این پژوهش محیط کامل موراشیک و اسکوگ (MS) بود. مقادیر ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار (دوچفا، هلند) به محیط کشت اضافه شد. pH محیط کشت قبل از اضافه کردن آگار به میزان ۱±۵/۷ تنظیم گردید. سپس، محیط کشت‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گشتند. پس از کشت ریزنمونه‌ها، نمونه‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی، منتقل شدند.

کشت درون شیشه‌ای بذرها

بذرهای تازه *P. aculis* از بذرفروشی معتبر در شهر کرج خریداری گردید. چینه سرمایی بذرها به مدت ۲۰ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. برای سترون کردن ابتدا بذرها به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور گردیده، سپس با استفاده از محلول دو درصد هیپوکلریت سدیم حاوی دو قطره توین ۲۰ ضدعفونی شده و بلافاصله ۳ مرتبه با آب مقطر استریل به‌مدت ۱۵، ۱۰ و ۷ دقیقه، شستشو داده شدند. سپس بذرها در محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده رشد در پتری دیش (۱۵ × ۹۰ میلی‌متر) کشت گردید.

کشت نوک شاخساره

نوک شاخساره (حدود ۳ میلی‌متر طول) دانهال‌های سه هفته‌ای که در شرایط درون شیشه‌ای رشد کردند بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت نوک شاخساره از شیشه‌های شفاف استریل (۹۰ × ۷۰ میلی‌متر) استفاده شد.

برای دستیابی به بهترین محیط کشت برای تکثیر درون شیشه‌ای *P. acaulis* دو آزمایش در قالب فاکتوریل و بر پایه طرح کاملا تصادفی به‌صورت زیر اجرا گردید.

آزمایش اول: ۳ سطح BA (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با چهار سطح NAA (صفر، ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر).

آزمایش دوم: ۳ سطح TDZ (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی-گرم در لیتر) در ترکیب با سه سطح NAA (۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر).

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

زمانی که گیاهچه‌های باززایی شده به رشد مطلوب خود رسیدند از محیط کشت برداشته شده و پس از شستشوی ریشه آن‌ها توسط آب مقطر استریل به گلدان‌های حاوی مخلوطی از ماسه و خاک استریل با نسبت حجمی یک به یک منتقل گردیدند و در شرایط محیطی ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شده و سپس برای ادامه رشد در گلخانه نگه‌داری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله نرم افزار SAS، مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel صورت گرفت. در آخر آزمایش صفاتی همچون درصد پاسخ ریزنمونه‌ها، تعداد شاخساره و تعداد ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

بذرهای پامچال کاشته شده در محیط MS بدون تنظیم کننده رشد گیاهی، در طی ۳۰-۲۰ روز جوانه زدند و درصد جوانه‌زنی آن‌ها بین ۳۷-۲۸ درصد متغیر بود.

۱۵ روز پس از کشت ریزنمونه‌های نوک شاخساره، تغییر در طول و اندازه اکثر ریزنمونه‌های انتهای شاخساره مشاهده گردید. شاخساره‌های باززا شده پس از طول ۲۵ روز ظاهر گردیده و با گذشت ۴۵ روز از کشت ریزنمونه‌ها، رشد شاخساره‌ها افزایش یافت (شکل۱).

باززایی شاخساره‌ها در همه‌ی ریزنمونه‌های پاسخ دهنده به‌طور مستقیم و بدون تشکیل کالوس بود. اثرات ساده و متقابل BA و TDZ در ترکیب با NAA برای کلیه صفات تفاوت معنی‌داری P>0.01 نشان دادند (جدول ۱ و ۲).

شکل ۱: باززایی *Primula acaulis* و رشد شاخساره پس از ۴۵ روز از کشت ریزنمونه-های نوک شاخساره.

Fig. 1: Plant regeneration from *in vitro* cultured shoot tips of *P. acaulis* L., after 45 days of cultivation on induction medium.

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در *Primula acaulis*

Table 1: Results of variation analysis of traits in *Primula acaulis*

Source of variation	df	Mean of square		
		% of xplants respond	No.of shoots regenerated	No.of roots per explant
BA	2	1354.75**	1.92**	10.75**
NAA	3	15488.91**	11.94**	57.33**
BA × NAA	6	131.41**	1.51**	5.08**
error	24	10.66	0.023	0.41
ضریب تغییرات (٪)		9.87	22.63	38.72

**: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**: Differences are significant in 1 % probability level.

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در *Primula acaulis*

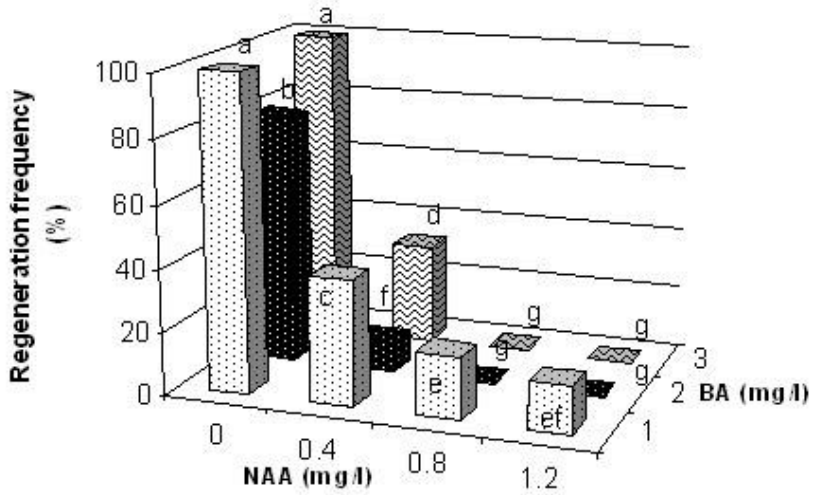
Table 2: Results of variation analyses of traits in *Primula acaulis*

Mean of square			df	Source of variation
No.of roots per explant	No.of shoots regenerated	% of xplants respond		
9.33**	2.04**	1006.33**	2	TDZ
32.33**	8.94**	6066.33**	2	NAA
26.33**	1.69**	488.83**	4	TDZ × NAA
0.77	0.035	25.00	18	error
28.34	18.54	8.78		CV(٪)

**: Differences are significant in 1 % probability level. **: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

حداکثر درصد پاسخ ریزنمونه‌ها در محیط‌هایی به‌دست آمد که تولید بیش‌ترین شاخساره را القا کردند. درصد پاسخ ریزنمونه‌ها در تیمارهای آزمایش اول، از صفر تا ۱۰۰٪ (شکل۲) و در تیمارهای دوم، از ۳۰ تا ۱۰۰٪ (شکل۳) متغیر بود. نسبت مستقیمی بین درصد پاسخ ریزنمونه‌ها و تولید شاخساره مشاهده شد. به‌طوری‌که تیمارهای با درصد بالای پاسخ ریزنمونه‌ها، بیش‌ترین شاخساره را تولید کردند.

غلظت بهینه‌ی تنظیم کننده‌های رشد برای تولید شاخساره‌های نابه‌جا بین تیمارها متفاوت بود. بهترین غلظت برای باززایی شاخساره در تیمارهای آزمایش اول، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA (جدول۳) و در تیمارهای دوم، در محیط کشت MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ (جدول ۴) بود، که به‌ترتیب ۳/۵ و ۳/۷ شاخساره به ازای هر ریزنمونه حاصل گردید.

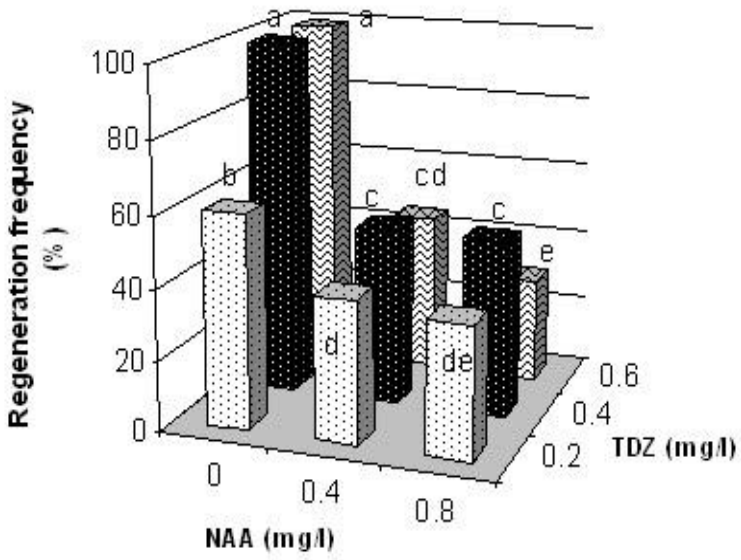


شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف BA و NAA بر روی درصد پاسخ ریز نمونه‌های نوک شاخساره گونه *Primula acaulis*

Fig 2: Effect of concentrations of BA and NAA, on percentage of regeneration from shoot tip explants of *Primula acaulis*

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون توکی در سطح ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

Mean in each column followed by same letters are not significantly different at 1% level using Tukey's test



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف TDZ و NAA بر روی درصد پاسخ ریز نمونه‌های نوک شاخساره گونه *Primula acaulis*

Fig 3: Effect of concentrations of TDZ and NAA, on percentage of regeneration from shoot tip explants of *Primula acaulis*

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون توکی در سطح ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

Mean in each column followed by same letters are not significantly different at 1% level using Tukey's test

جدول ۳: اثر ترکیب غلظت‌های مختلف BA و NAA بر روی تعداد شاخساره و ریشه در گونه *Primula acauls*.

Table 3: Effect of different concentrations of BA and NAA on number of shoots and roots of *Primula acauls*

Traits studied in explants		Growth regulators (mg/l)	
No.of roots	No.of shoots regenerated	NAA	BA
5.00 b	3.50 a	0	1
0.00 d	0.30 d	0.4	
0.00 d	0.20 de	0.8	
0.00 d	0.10 de	1.2	
3.00 c	1.00 c	0	2
1.00 d	0.10 de	0.4	
0.00 d	0.00 de	0.8	
0.00 d	0.00 de	1.2	
0.00 d	2.50 b	0	3
3.00 c	0.20 de	0.4	
8.00 a	0.00 de	0.8	
0.00 d	0.00 de	1.2	

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون توکی در سطح ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

Mean in each column followed by same letters are not significantly different at 1% level using Tukey's test

جدول ۴: اثر ترکیب غلظت‌های مختلف TDZ و NAA بر روی تعداد شاخساره و ریشه در گونه *Primula acauls*.

Table 4: Effect of different concentrations of TDZ and NAA on number of shoots and roots of *Primula acauls*

Traits studied in explants		Growth regulators (mg/l)	
No.of roots	No.of shoots regenerated	NAA	BA
2.00 c	1.00 c	0	
7.00 a	0.70 cd	0.4	۰/۲
3.00 bc	0.45 de	0.8	
0.00 d	3.70 a	0	
2.00 c	0.30 def	0.4	۰/۴
8.00 a	0.90 c	0.8	
4.00 b	2.00 b	0	
2.00 c	0.20 ef	0.4	۰/۶
0.00 d	0.10 f	0.8	

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون توکی در سطح ۱ درصد معنی‌دار نیستند.

Mean in each column followed by same letters are not significantly different at 1% level using Tukey's test

ترکیب سیتوکینین با اکسین، شرط لازم برای باززایی از ریزنمونه‌های مختلف در اکثر گیاهان است (Hosokawa *et al*. 1996; Zucker *et al*. 1997). *کومانس* و همکاران (Coumans *et al*. 1979) شاخسارهای نابه‌جا را در گونه‌ی *P. obconica* با کشت جوانه‌های گل به‌دست آوردند. این پژوهش‌گران غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA را بهترین غلظت برای تولید شاخساره معرفی کردند و هنگامی که از غلظت‌های بالای BA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده کردند. به‌جای جوانه‌های رویشی جوانه‌های زایشی تولید گردید. *بورودیلینا* و همکاران (Borodulina *et al*. 2001) حداکثر ضریب تکثیر را در محیط پایه B5 ، *گامبورگ* (Gamborg *et al*. 1968) که حاوی ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۷ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید به‌دست آوردند. در پژوهش حاضر جیبرلیک اسید مورد استفاده قرار نگرفت.

برعکس محیط‌های کشت حاوی BA، همه‌ی محیط‌های کشت حاوی TDZ حداقل تعداد شاخساره تولید کردند و هیچ ریزنمونه‌ای نکرزه (قهوه‌ای) نگردید. TDZ اثر قوی‌تری در القای تولید شاخساره در گیاهان چوبی (Huetteman & Preece 1993; Lane *et al*. 1993) و گیاهان زینتی (Lin *et al*. 1998) داشته است. اثر TDZ بر روی تولید شاخساره‌های نابه‌جا در بعضی از گونه‌های پامچال قبلا گزارش شده است: *P. cuneifolia* var. Hakusanensis (Shimada *et al*. 1997)، *P. vulgaris* L. و *P. elatior* L. (Schween & Schwenkel 2002 & 2003) و *Primula* × *pubescens* Jacq. (Takihira *et al*. 2007). این پژوهش‌گران نتیجه گرفتند که TDZ تاثیر بیش‌تری نسبت به سایر سیتوکینین دارد.

تعداد ریشه‌های اصلی و فرعی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفت. به‌طوری‌که بیش‌ترین تعداد ریشه در تیمارهای آزمایش اول در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA+ ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA (جدول۱) و در تیمارهای آزمایش دوم در محیط حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر TDZ + ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA (جدول۲) مشاهده گردید.

در مطالعه حاضر، ریشه‌ها همانند شاخساره‌ها به‌طور مستقیم و بدون تشکیل کالوس ایجاد شدند و غلظت‌های نسبتاً بالای NAA (۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) تعداد ریشه‌های کمتری تولید شد. ریشه‌زایی در گونه‌های *P. malacoides* و *P. obconica* در محیط ½MS ، بدون تنظیم کننده‌ی رشد صورت گرفته است (Mizuhiro *et al*. 2001a). استفاده از اکسین‌ها از قبیل NAA ریشه‌دهی را در اکثر گونه‌ها پامچال افزایش می‌دهد (Borodulina *et al*. 2001; Takihira *et al*. 2007).

از نکات مهم در این پژوهش، تولید ریشه بدون نیاز به واکشت و انتقال به محیط‌های مکمل ریشه‌زایی بود. این نتیجه با نتایج پژوهش *بنسون* و همکاران (Benson *et al*.

2000) بر روی گونه *P. scotica* (گونه نادر اسکاتلندی) در توافق است. در آخر آزمایش، تعدادی از شاخساره‌های ریشه-دار شده به‌طور موفقیت آمیزی به بیرون انتقال یافتند.

در این مطالعه یک سیستم ساده و سریع برای تکثیر درون شیشه‌ای پامچال (*P. acaulis*) ارائه شده است. هم-چنین، علی‌رغم وجود مشکلات در جوانه‌زنی، گیاهان به‌دست آمده در تیمارهای مختلف کشت در این مطالعه توانایی استقرار داشتند و لذا با یافته‌های این پژوهش می‌توان یک سیستم موفق تکثیر تنظیم و ارائه نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از آقای مهندس مهدی صالحی به‌علت بازخوانی این مقاله کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۹-۱۰ متن انگلیسی مراجعه شود.

In Vitro Propagation of Primrose (*Primula Acaulis* L.), Via Shoot Tip Explants

Noroozi Sharaf[1], A. R., Gholami[2*], M., Hamidoghli[3], Y. and Zakizadeh[3], H.

Abstract

This study carried out on commercial primrose (*Primula acaulis* L.). The aim of the present study was to establish an efficient and reproducible protocol for *in vitro* propagation of *P. acaulis* from shoot tips. First of all seeds were cultured on MS (Murashig & Skoog) medium without plant growth regulators. Afterwards, the seedling-derived shoot tips were cultured on MS basal medium, containing various concentrations of 6-benzylaminopurine (BA) and thidiazuron (TDZ) in combination with various concentrations of 1-naphthaleneacetic acid (NAA). The experiments was carried out in two factorial design on the basis of completely randomize design. The result showed that the frequency of shoot regeneration was 0 to 100% in the first experiment and 30 to 100% in the second one. The highest shoot regeneration in first and second experiments, considerably affected by MS media containing 1 mgL^{-1} BA and also 0.4 mgL^{-1} TDZ, respectively. Regenerated shoots easily rooted without the necessity for transfer to a rooting medium. Number of roots significantly affected by media supplemented with 3 mgL^{-1} BA + 0.8 mgL^{-1} NAA and 0.4 mgL^{-1} TDZ + 0.8 mgL^{-1} NAA. Finaly, plantlets were hardened-off and transferred to soil for further growth.

Keywords: Micropropagation, Shoot regeneration, *Primula* spp, Thidiazuron

References

Benson, E. E., Danaher, J. E., Pimbley, I. M., Anderson, C. T., Wake, J. E., Daley, S. and Adams, L. K. 2000. *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. Journal of Biodiversity and Conservation. 9: 711–726.

Borodulina, I. D., Vechernina, N. A. and Dolganova, Z. V. 2001. *In vitro* propagation of two hybrid *Primula* L. species. Journal of Rastitel'nye Resursy. 4: 114–122.

Coumans, M., Coumans-Gillès, M. F, Delhez J. and Gaspar, T. 1979. Mass propagation of *Primula obconica*. Journal of Acta Horticulturae. 91: 287–293.

Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. Journal of Experimental Cell Research. 50: 151–158.

Hosokawa, K., Nakano, M., Oikawa, Y. and Yamamura, S. 1996. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. Journal of Plant Cell Report. 15: 578–581

Huetteman, C. A. and Preece, J. E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Journal of Plant Cell Tissue Organ Culture. 73: 105–119.

Lane, D. W., Iketani, H. and Hayashi, T. 1998. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* L.). Journal of Plant Cell Tissue Organ Culture. 54: 9–14.

Lin, S. H., De Jeu, M. J. and Jacobsen, E. 1997. Direct shoot regeneration from excised leaf explants of *in vitro* grown seedlings of *Alstroemeria* L. Journal of Plant Cell Report. 16: 770–774.

Mizuhiro, M., Yamada, K., Ito K., Kadowaki, S., Ohashi, H. and Mii, M. 2001a. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Primula malacoides* L. and *Primula obconica* L. Journal of Plant Science. 160: 1221–1228.

Mizuhiro, M., Ito, K. and Mii, M. 2001b. Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Primula malacoides* L. and *P. obconica* L. Journal of Plant Science. 161: 489–496.

Morozowska, M. and Wesołowska, M. 2004. *In vitro* clonal propagation of *Primula veris* L. and preliminary phytochemical analysis. Journal of Acta Biologia Cracoviensia Botanica. 46: 169–175.

Okršlar, V., Plaper, I., Kovač, M., Erjavec, A., Obermajer, T., Rebec, A., Ravnikar, M. and Žel, J. 2007. Saponins in tissue culture of *Primula veris* L. Journal of *In Vitro* Cell Development Biological. 43: 644–651.

Sanei-Shariatpanahi, M. 2009. Culturing, maintaining and propagation of indoor plants. Sepehr publisher. Tehran (in Farsi).

1 and 3. PhD Student and Assistant Professors respectivly, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht.

2. Associated professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan.

∗: Corresponding author

Shimada, T., Matsushita, T. and Otani, M. 1997. Plant regeneration from leaf explants of *Primula cuneifolia* var. hakusanensis, “Hakusankozakura”. Journal of Plant Biotechnology. 14: 47–50

Schween, G. and Schwenkel, H. G. 2002. *In vitro* regeneration in *Primula* ssp. via organogenesis. Journal of Plant Cell Report. 20: 1006–1010.

Schween,, G. and Schwenkel, H. G. 2003. Effect of genotypes on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. Journal of Plant Cell Tissue Organ Culture. 72: 53–61.

Takihira, M., Otani, M., Tsuchiya, S. and Shimada, T. 2007. Plant regeneration from leaf explants of auricula cultivars (*Primula* × *pubescens* Jacq.). Journal of Plant Biotechnology. 24: 425–427.

Yamamoto, T., Magaya, Y. and Maruyama, Y. 1999. Mass propagation of *Primula sieborldii* E. Morr. Through leaf segment culture. Journal of Bulletin Minami-Kyusyu University. 29 (A): 9–14.

Zucker, A., Ahroni, A., Shejtman, H. and Vainstein, A. 1997. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gipsophila paniculata* L. Journal of Plant Cell Report. 16: 775–778.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 35-41= ۳۵-۴۱).