تأثیر همگروه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر تولید پینه و سوخک با استفاده از ریزنمونه‌های تهیه شده از سوخ دختری لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.)

سعداله علیزاده اجیرلو[1]* و محمد کارگر[2]

۱*- **نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز (azajirlo@tabrizu.ac.ir)

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

چکیده

ریز ازدیادی بهترین روش برای جلوگیری از انقراض و تکثیر لاله واژگون می‌باشد. در این آزمایش اثرات ترکیبی ازتنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین بر تولید پینه و سوخک در ریز نمونه‌های گرفته شده از فلس سوخ دختری لاله واژگون و از دو همگروه متعلق به دشت ارژن و کوهرنگ مورد بررسی قرارگرفت. برای این منظور سه نوع ترکیب از تنظیم‌کننده‌های رشد و در هر یک NAA در سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) با یکی از سایتوکینین‌های کینتین، 2iP یا درسه غلظت (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر) استفاده شد. محیط کشت پایه شامل MS با ٤/٥ درصد ساکارز و ۸ گرم بر لیتر آگار بود. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار پنج ریز نمونه اجرا شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که کینتین و 2ip تأثیر معنی‌داری بر درصد پینه زایی نداشتند اما اثر معنی‌داری بر آن داشت. بیشترین میزان تولید پینه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. در این تیمار ٦۰ درصد ریز نمونه‌ها قادر به تشکیل پینه شدند. محیط کشت حاوی یک میلی گرم در لیترکینتین در ترکیب با یک میلی گرم در لیتر NAA به تولید سوخک مستقیم و غیرمستقیم بیشتری از سایر محیط‌های کشت و با میانگین ۵/۵ سوخک در هر ریز نمونه منجر شد. با لحاظ کردن کارایی و هزینه NAA و عوامل زیست‌محیطی توصیه می‌شود که غلظت‌های پایین آن در القاء سوخک‌زایی به کار برده شود.

کلید واژه‌ها: **لاله واژگون، سوخک، NAA، کینتین، 2ip.**

مقدمه

لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) یکی از گیاهان زینتی و دارویی بومی ایران است و به صورت خودرو در مناطق مرتفع و کوهستانی رشته کوه‌های زاگرس از آذربایجان تا چهارمحال و بختیاری و فارس رویش دارد. گونه‌های *F. imperialis* و *F. persica* به خاطر داشتن گل‌های درشت و جذاب، گیاهان زینتی مهمی هستند و برای این محصول به‌عنوان گل بریده و گلدانی بازار وجود دارد (Leeuwen *et al.*, 2002؛ Metin *et al.*, 2013). مطالعات متعددی در مورد خواص بیوشیمیایی و دارویی این گیاه صورت گرفته است. آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای متعددی در این گیاه‌شناسایی شده و کشت بافت بعضی از گونه‌های این جنس به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است (Rahman *et al.*, 2002). گونه‌هایی از جنس لاله واژگون که در سایر نقاط دنیا وجود دارند، به شدت محافظت می‌گردند. به‌عنوان مثال گونه *F. montana* در ایتالیا در لیست قرمز گونه‌های گیاهی در معرض تهدید قرار دارد (Mancuso *et al.*, 2012). ایران

یکی از خاستگاه‌ها و محل تنوع گیاه لاله واژگون است. بیش از ۱۴ گونه از این جنس از ایران گزارش شده است و گونه‌هایی همانند *F. imperialis*، *F.persica* و *F. kotschyana* پس از خروج از ایران در هلند و آمریکا تجاری شده‌اند. متأسفانه هیچ‌گونه محافظتی از این گیاه در کشور صورت نمی‌گیرد و از طرف دیگر این ذخیره ژنتیکی ارزشمند در سال‌های اخیر به علت تخریب مراتع، چرای بی‌رویه و طغیان آفات به شدت در حال انقراض است (Ebrahimie *et al.*, 2006).

Witomska and Lukaszewska (۱۹۹۷) ابتدا تعداد ۲۲ عدد سوخ *F. imperialis* cv. Rubra Maxima را دو سال کشت کردند تا سوخک‌های کوچک ایجاد کنند. سپس ریزنمونه‌هایی را از قسمت‌های مختلف آن گرفتند. درصد بالایی از ریزنمونه‌ها آلوده شده و یا از بین رفتند و درصدی از پینه‌های[1] ایجاد شده، پس از ۲ ماه تولید سوخک کردند. هم‌چنین این گروه تحقیقاتی با کاربرد ریزنمونه‌های برگ، ساقه و نهنج اقدام به تکثیر این گیاه کردند اما درصد باززایی بسیار پایین بود.

Mohammadi-Dehcheshmeh و همکاران (۲۰۰۷) توانستند با استفاده از کشت قطعات گلبرگ گونه *F. imperialis* پینه و سوخک تولید کنند. آن‌ها تأثیر پیش تیمار ریزنمونه‌ها با سرما، نور و سیتوکینین ها را در زنده مانی ریزنمونه ها و القاء پینه و سوخک مورد مطالعه قرار دادند. Paek and Murphy (۲۰۰۲) با استفاده از کشت قطعاتی از سوخ گونه *F. thunbergi* نتوانستند مقادیر زیادی سوخک تولید کنند. آن‌ها بررسی‌های زیادی درمورد کشت بافت این گونه انجام دادند و بر اساس نتایج آن‌ها میزان نسبتاً بالایی از ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[2] حاوی هورمون نفتالین استیک اسید[3] و غلظت‌های متفاوت هورمون سایتوکینین تولید سوخک کردند. Rahimi و همکاران (۲۰۱۳) با آزمایشاتی که بر روی کشت فلس، برگ‌های اولیه و گلبرگ لاله واژگون انجام داد به القاء پینه موفق شدند. پینه‌های تولید شده بر روی فلس و برگ اولیه، اندازه بیشتری نسبت پینه‌های حاصل از گلبرگ داشتند. روش‌های تکثیر سنتی مانند فلس‌برداری و تقسیم سوخ نمی‌توانند روش مناسبی برای تکثیر سریع این گیاه باشند. در تکثیر جنسی از طریق بذر تحت شرایط ایده‌آل بعد از ۵ تا ۶ سال سوخی که توانایی تشکیل گل را داشته باشد، حاصل می‌شود (Khalighy, 1991). این گیاه معمولاً از طریق سوخ مادری ازدیاد می‌شود. هر سوخ مادری قادر به تولید دو سوخک در سال می‌باشد. این نسبت پایین موجب محدودیت در تکثیر این گل شده است (Paek and Murphy, 2002). با در نظر گرفتن مسائل فوق، ریزازدیادی بهترین روش برای تکثیر این گیاه می‌باشد (Bajaj, 1988؛Arora and Bhojwani, 1989). تکنیک کشت بافت پتانسیل بالقوه‌ای در زمینه تکثیر انبوه این گیاه دارد. بنابراین مهم‌ترین مسئله در نجات این گیاه از انقراض و حفظ تنوع ژنتیکی ارزشمند آن، بهینه ساختن روش تکثیر این گیاه در شرایط کشت بافت می‌باشد. هم‌چنین برای انجام به‌نژادی غیرکلاسیک داشتن روند کار مناسبی از کشت بافت ضروری می‌باشد. بدین جهت در این آزمایش اثرات ترکیبی از تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین بر تولید پینه و سوخک در دو هم‌گروه[4] محلی لاله واژگون مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سوخ‌های لاله واژگون در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۹ از دو منطقه کوهستانی دشت ارژن واقع در کیلومتر ۴۵ جاده شیراز- بوشهر و دشت لاله‌های واژگون کوهرنگ واقع در استان چهارمحال و بختیاری در مرحله تمام گل جمع‌آوری شدند. در هنگام جمع‌آوری نمونه‌ها، سوخ‌هایی که به ظاهر آلوده و نامطلوب و نیز

1- Callus
2- Murashig and Skoog
3- Naphtalen Acetic Acid
4- Clone

دارای فلس رویی چروکیده و بافت مرده بودند، حذف گردیدند. مواد گیاهی به آزمایشگاه منتقل شدند. سوخ‌ها ابتدا با آب جاری شسته و سپس در فضای آزمایشگاه خشک شدند. به‌منظور جلوگیری از رشد قارچ، سوخ‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. در نهایت سوخ‌ها را ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده و بعد از خشک شدن سطح فلس‌ها در دمای اتاق، در داخل یخچال با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جهت رفع نیاز سرمایی، سوخ‌ها پس از شستشو و خشک شدن به صورت جداگانه در داخل لیوان‌های کاغذی قرار گرفتند. روی لیوان حاوی نمونه با پوشش محافظ پلاستیکی بسته شد. ظروف حاوی نمونه‌ها به درون یخچال با دمای ۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند. پس از رفع رکود، سوخ‌های دختری در اتاق رشد (دمای ۲۵ درجه در روز و ۱۸ درجه شب با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت) متورم شدند و پس از گذشت سه ماه سوخ‌های دختری به اندازه قابل توجهی رسیده و از این سوخ‌ها در مراحل بعد برای بدست آوردن ریزنمونه جهت کشت بافت استفاده شد.

در این تحقیق از محیط کشت پایه MS استفاده شد. به ازای هر یک لیتر محیط کشت مقدار ۴۵ گرم ساکارز نیز به محیط کشت اضافه گردید. برای ضد عفونی در مرحله کشت، سوخک‌های بوجود آمده از سوخ مادری جدا شده و به مدت دو ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند. در ادامه مراحل ضدعفونی، سوخک‌ها پس از آبکشی در الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه قرار داده شده و بعد با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد (تهیه شده از محلول ۵ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری) به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و در نهایت سوخک‌ها سه بار با آب مقطر استریل و در مجموع به مدت ۳۰ دقیقه شستشو شدند. برای تهیه ریز نمونه سوخک ها بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند و فلس‌ها از یکدیگر جدا شدند. قطعات ریز نمونه‌ها به اندازه ۵×۵ میلی‌متر از برش فلس به‌دست آمدند. ریز نمونه‌ها به صورت افقی به‌طوری‌که سمت برآمده ریز نمونه جهت محیط کشت باشد، بر روی محیط کشت قرار گرفتند و جهت تولید سوخک، به اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. به‌منظور القاء پینه و تولید سوخک از ریزنمونه‌های تهیه شده، سه نوع ترکیب از تنظیم‌کننده‌های رشد (در محیط کشت پایه که در بالا اشاره شد) شامل NAA در سه غلظت (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و یکی از سایتوکینین‌های کینتین[1]، 2iP[2] و TDZ[3] درسه غلظت (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر) استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار پنج ریز نمونه اجرا شد. در پایان پنجمین هفته پس از کشت، ریزنمونه‌هایی که قادر به تشکیل پینه شده بودند شمارش گردیدند و به‌عنوان معیار ارزیابی درصد پینه زایی مورد استفاده قرار گرفتند. برای شمارش سوخک‌های تولید شده، ۶۰ روز پس از کشت اقدام گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ صورت پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال ۵ درصد، انجام و نمودارها با نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

تولید پینه

در این بررسی سه هفته پس از کشت، تورم بافت و شروع پینه زایی بر روی ریزنمونه‌ها آغاز شد و پس از گذشت پنج هفته پینه هایی با رنگ زرد کرمی به اندازه کافی رشد کردند و در بعضی کشت ها بافت جدید در نهایت بافت اولیه ریزنمونه را تقریباً پوشاند (شکل ۱).

1- Kinetin
2- γ,γ-dimethyl allyl amino purine or Isopentenyl amino purine
3- Thidiazuron

شکل ۱- تشکیل پینه در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ

Fig. 1. Callus formation in MS medium containing 0.5 mg/l NAA along with 0.5 mg/l TDZ

آنالیز داده‌ها نشان داد که پاسخ به پینه‌زایی ریزنمونه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کینتین، اثر متقابل کینتین و NAA و نوع همگروه نمی‌باشد (جدول ۱) و در هر دو همگروه بیش‌ترین درصد پینه زایی مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد. با بررسی تأثیر ترکیبات هورمونی حاوی غلظت‌های مورد استفاده 2iP معلوم شد که اثرات متقابل 2iP و NAA، همگروه و NAA، همگروه و 2iP و نیز همگروه، 2iP و NAA در پینه‌زایی معنی‌دار و موثر نبود (جدول ۲). درحالی‌که در تیمارهای حاوی TDZ درصد پینه‌زایی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و TDZ و اثر متقابل TDZ و NAA قرار گرفت (جدول ۳). در همه تیمارهای حاوی TDZ پینه به وجود آمد، ولی تعداد ریزنمونه‌های تشکیل دهنده پینه و نیز اندازه آن‌ها متفاوت بود. بیش‌ترین درصد پینه‌زایی در هر دو همگروه محلی با استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ ثبت شد که در تیمار اخیر ۶۰ درصد ریزنمونه‌ها قادر به تشکیل بافت پینه شدند (نمودار ۱).

نیاز به مواد تنظیم کننده رشد در تولید پینه، بسته به نوع و رقم گیاه در سه گروه فقط نیازمند به حضور اکسین، یا فقط سایتوکینین و یا هر دو نوع ترکیب می‌باشد. پینه‌ها با توجه به محیطی که باعث القاءآن‌ها می‌شوند، به اشکال و رنگ‌های مختلف در محیط کشت ظاهر می‌شوند (Pierik, 1987).

Nuth و همکاران (۲۰۰۱) توانستند از پینه‌های فشرده گره‌دار در سوسن، جنین به‌دست آورند و طبق مشاهدات آن‌ها پینه‌های جنین‌زا دارای رنگ زرد تیره بوده و به آسانی در میان دیگر پینه‌ها قابل تشخیص بودند.

تولید سوخک یا سوخک‌زایی مستقیم

در پایان هفته نهم سوخک‌ها به حد کافی بزرگ شدند و در این زمان نمونه‌های دارای سوخک شمارش گردیدند و به عنوان معیار ارزیابی در درصد نمونه‌های دارای سوخک مورد استفاده قرار گرفتند. در درصد بالاتری از مواد گیاهی مربوط به منطقه کوهرنگ نسبت به کشت‌های متعلق به منطقه دشت ارژن تشکیل سوخک ملاحظه شد ولی از لحاظ نوع سوخک، اختلاف معنی‌داری در میانگین تولید سوخک در اثر سوخک‌زایی غیرمستقیم مابین دو همگروه مشاهده نشد و هر دو همگروه از توانایی تقریباً مشابهی در سوخک‌زایی غیرمستقیم برخوردار بودند.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر عوامل مورد بررسی بر صفات مورد مطالعه در ترکیب‌های سطوح NAA با کینتین

Table 1. Analysis of variance for effect of different factors on studied traits using combinations of NAA and Kinetin levels

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Means of squares				
		تولید کل سوخک Total produced bulblet	تعداد ریز نمونه دارای سوخک Number of explants containing bulblet	تولید سوخک در اثر باززایی مستقیم Bulblet formation via direct regeneration	تولید سوخک در اثر باززایی غیرمستقیم Bulblet formation via direct regeneration	درصد پینه‌زایی Callus formation percentage
نفتالین استیک اسید NAA	2	25.75^{**}	3728.26^{**}	19.26^{**}	0.93^{*}	506.08^{*}
کینتین Kinetin	2	9.59^{**}	1263.40^{**}	5.26^{**}	0.66^{ns}	286.23^{ns}
همگروه Clone	1	0.03^{ns}	461.54^{*}	0.05^{ns}	0.01^{ns}	0.51^{ns}
اثر متقابل NAA و کینتین Interaction of NAA and kinetin	4	3.64^{**}	595.32^{**}	4.28^{**}	0.12^{ns}	100.37^{ns}
اثر متقابل NAA و همگروه Interaction of NAA and clone	2	0.41^{ns}	1.55^{ns}	0^{ns}	0.41^{ns}	164.16^{ns}
اثر متقابل کینتین و همگروه Interaction of kinetin and clone	2	0.10^{ns}	4.69^{ns}	0.01^{ns}	0.12^{ns}	47.10^{ns}
اثر متقابل NAA، کینتین و همگروه Interaction of NAA, kinetin and clone	4	0.04^{ns}	1.57^{ns}	0.11^{ns}	0.16^{ns}	62.14^{ns}
خطای آزمایشی Trial error	54	0.32	74.42	0.26	0.28	98.57

ns، * و ** به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ ٪ را نشان می‌دهند.

ns, * and ** show no significant differences, significant at the 5 and 1 % respectively.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر عوامل مورد بررسی بر صفات مورد مطالعه در ترکیب‌های سطوح NAA با 2ip

Table 2. Analysis of variance for effect of different factors on studied traits using combinations of NAA and 2ip levels

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Means of squares				
		تولید کل سوخک Total produced bulblet	تعداد ریز نمونه دارای سوخک Number of explants containing bulblet	تولید سوخک در اثر باززایی مستقیم Bulblet formation via direct regeneration	تولید سوخک در اثر باززایی غیرمستقیم Bulblet formation via direct regeneration	درصد پینه‌زایی Callus formation percentage
نفتالین استیک اسید NAA	2	15.41**	2018.40**	14.69**	0.66*	386.35*
ایزوپنتیل آمینوپیورین 2iP	2	1.69**	397.11ns	0.73	0.43	215.91
همگروه Clone	1	0.52ns	713.02*	0.01ns	0.42	117.19
اثر متقابل NAA و 2iP Interaction of NAA and 2iP	4	2.69**	460.81*	3.42**	0.15	50.55
اثر متقابل NAA و همگروه Interaction of NAA and clone	2	0.16ns	31.59ns	0.29ns	0.03	47.89
اثر متقابل 2iP و همگروه Interaction of 2iP and clone	2	0.01ns	19.57ns	0.04ns	0.05	10.78
اثر متقابل NAA، 2iP و همگروه Interaction of NAA, 2iP and clone	4	0.04ns	24.80ns	0.02ns	0.05	62.63
خطای آزمایشی Trial error	54	0.30	129.55	0.29	0.20	71.97

ns، * و ** به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ ٪ را نشان می‌دهند.

ns, * and ** show no significant differences, significant at the 5 and 1 % respectively.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر عوامل مورد بررسی بر صفات مورد مطالعه در ترکیب‌های سطوح NAA با TDZ

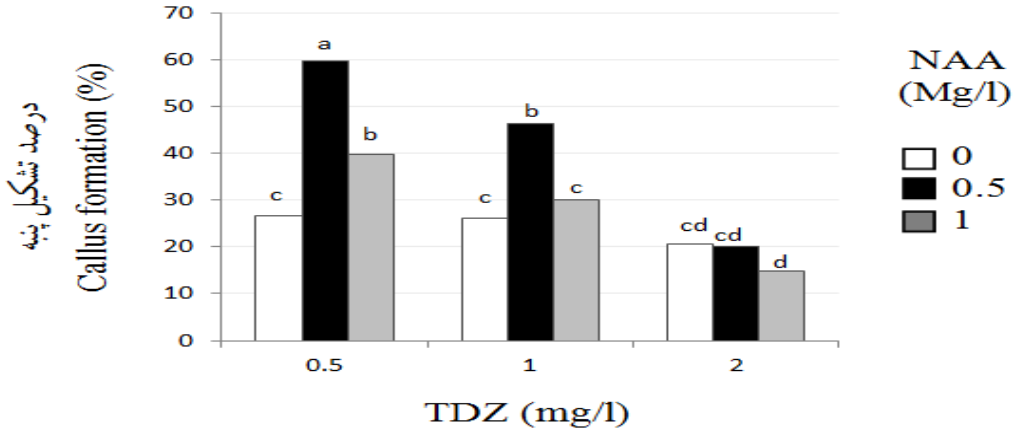
Table 3. Analysis of variance for effect of different factors on studied traits using combinations of NAA and TDZ levels

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Means of squares				
		تولید کل سوخک Total produced bulblet	تعداد ریز نمونه دارای سوخک Number of explants containing bulblet	تولید سوخک در اثر باززایی مستقیم Bulblet formation via direct regeneration	تولید سوخک در اثر باززایی غیرمستقیم Bulblet formation via direct regeneration	درصد پینه‌زایی Callus formation percentage
نفتالین استیک اسید NAA	2	6.38^{**}	1368.22^{**}	2.56^{**}	1.48^{**}	1730.41^{**}
تیدیازورون TDZ	2	0.43^{**}	42.95^{ns}	0.45	0.32^{ns}	2694.83^{**}
همگروه Clone	1	0.53^{ns}	193.24^{ns}	0.44^{ns}	0.01^{ns}	1.93^{ns}
اثر متقابل NAA و TDZ Interaction of NAA and TDZ	4	0.23^{ns}	13.03^{*}	0.17^{**}	0.10^{ns}	470.41^{**}
اثر متقابل NAA و همگروه Interaction of NAA and clone	2	0.03^{ns}	17.75^{ns}	0.16^{ns}	0.05^{ns}	3.23^{ns}
اثر متقابل TDZ و همگروه Interaction of 2iP and clone	2	0.29^{ns}	62.79^{ns}	0.15^{ns}	0.06^{ns}	36.53^{ns}
اثر متقابل NAA، TDZ و همگروه Interaction of NAA, TDZ and clone	4	0.09^{ns}	6.14^{ns}	0.11^{ns}	0.09^{ns}	35.06^{ns}
خطای آزمایشی Trial error	54	0.38	61.67	0.20	0.25	80.00

ns، * و ** به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ ٪ را نشان می‌دهند.

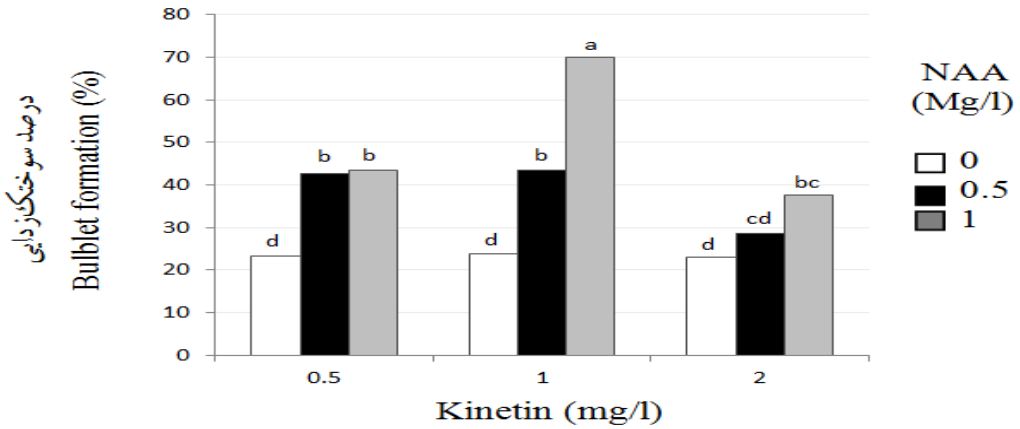
ns, * and ** show no significant differences, significant at the 5 and 1 % respectively.

در این آزمایش استفاده از سه نوع سیتوکینین مورد بررسی به نتایج مختلفی منجر گردید. نتایج بدست آمده از کاربرد غلظت‌های مختلف NAA در ترکیب با TDZ در میانگین تعداد سوخک در هر نمونه رضایت بخش نبود (جدول ۳) و غلظت‌های مختلف ترکیب این تنظیم کننده نتوانستند در این زمینه موثر واقع شوند و از لحاظ آماری بین ترکیب غلظت‌های مختلف در تولید سوخک تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به علاوه تشکیل سوخک وابسته به غلظت‌های مختلف TDZ، نوع همگروه، اثر متقابل NAA با TDZ و اثر متقابل NAA، TDZ و همگروه نمی‌باشد و تفاوت معنی‌داری مابین غلظت های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و یک میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده نشد (جدول ۳). بررسی نتایج ترکیبات دیگر نشان داد که درصد کشت هایی که در آن‌ها سوخک ایجاد شد به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف NAA، اثر متقابل کینتین و نوع همگروه و اثر متقابل کینتین و NAA قرار داشت. با استفاده از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین در درصد بیشتری (۷۰ درصد) از ریزنمونه‌ها منجر به تشکیل سوخک شد (نمودار ۲ و جدول ۱).



نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA در ترکیب با TDZ بر درصد پینه‌زایی

Graph 1. Effect of different concentrations of NAA in combination with TDZ on percentage of callus formation

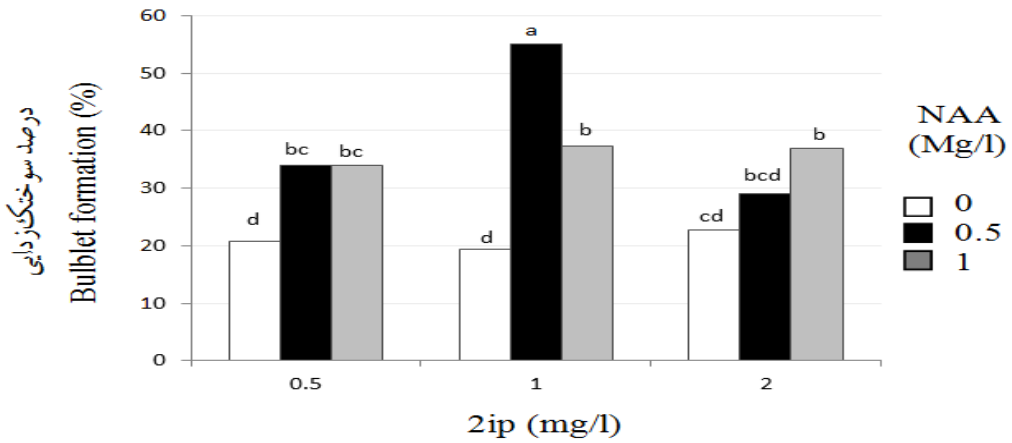


نمودار ۲- درصد ریزنمونه‌های تشکیل‌دهنده سوخک در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف NAA و کینتین

Graph 2. Percentage of bulblet forming explants on media containing different concentrations of NAA in combination with Kinetin

تجزیه واریانس مربوط به بررسی تأثیر 2ip در ترکیب با NAA نشان داد که غلظت‌های مختلف NAA، 2iP و اثر متقابل NAA با 2ip (در سطح احتمال یک درصد) تأثیر معنی‌داری در تولید سوخک در کشت‌ها شدند (جدول ۲) و بهترین تیمار به‌منظور باززایی مستقیم سوخک مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر 2iP می‌باشد (نمودار ۳). تنظیم‌کننده‌های گروه سیتوکینین‌ها در ترکیب با اکسین‌ها موجب افزایش باززایی می شوند. در آلسترومریا[1] افزودن سایتوکینین به محیط کشت باززایی را بهبود بخشید (Metzger, 1986). Chen and Chang (۲۰۰۰) در آزمایشی برای القاء پینه در بافت‌های اونسیدیوم[2] (نوعی ارکیده) به ضروری بودن سیتوکینین (TDZ) در ترکیب با اکسین (2-4-D) اشاره کردند. غلظت و نوع سایتوکینین مورد استفاده، اثر زیادی بر تشکیل سوخک از قطعات فلس گونه تونبرگی لاله واژگون گزارش شد و به کاربردن غلظت ۰/۳۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۰/۴۷ میلی‌گرم در لیتر 2iP در این گونه ۸ عدد سوخک از هر ریز نمونه تولید شد. هم‌چنین ملاحظه شد که NAA مؤثرترین اکسین به‌منظور القاء سوخک در شرایط درون شیشه‌ای از قطعات فلسی است (Paek and Murphy, 2002). در هر دو همگروه، تیمار یک میلی‌گرم در لیتر کینتین در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین تعداد سوخک مستقیم در هر ریزنمونه را موجب شد (نمودار ۴) در تیمار اخیر میانگین تولید به ازاء هر ریزنمونه ۵/۵ سوخک بود.

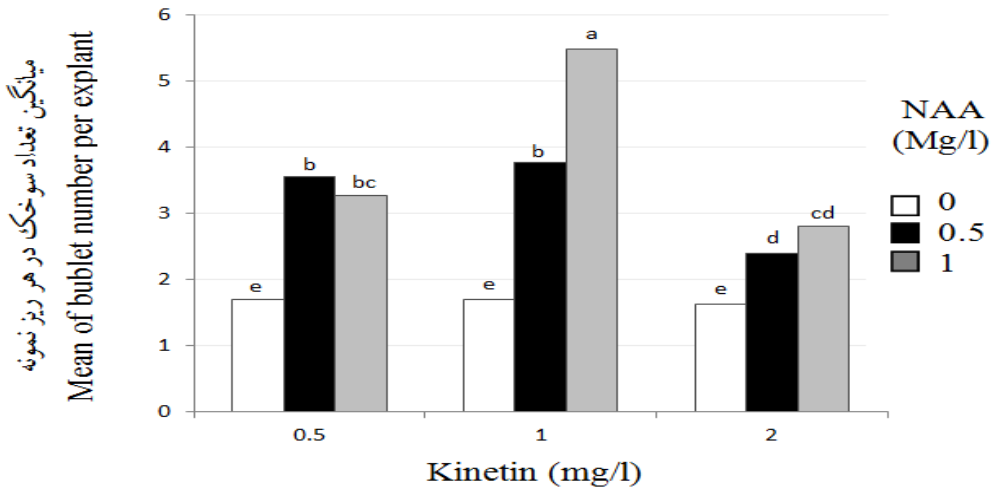
کمترین میزان سوخک در تیمار فاقد NAA در تیمارهای با غلظت‌های مختلف کینتین مشاهده شد. به نظر می‌رسد که در تیمار اخیر باتوجه به مقدار صفر میلی‌گرم در لیتر NAA، سطح غلظت کینتین برای القاء سوخک در مواد گیاهی کشت شده در حد کافی نبوده است. هم‌چنین جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین (NAA) و سایتوکینین (2iP) بر روی میانگین تعداد سوخک تشکیل شده در هر ریز نمونه معنی‌دار بوده است. تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر 2iP بیش‌ترین میانگین تعداد سوخک را در هر کشت تولید کرد و در این تیمار به‌طور میانگین برای هر کدام ۳/۸۷۵ سوخک شمارش شد (نمودار ۵).



نمودار ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA در ترکیب با 2iP بر درصد سوخک‌زایی

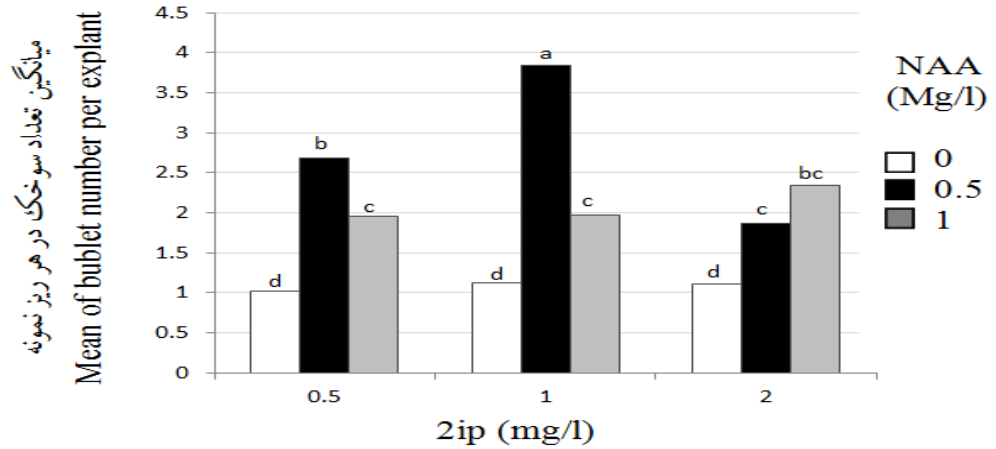
Graph 3. Effect of different concentrations of NAA in combination with 2ip on bulblet formation percentage

1- Alstroemeria
2- Oncidium



نمودار ٤- میانگین تعداد سوخک در هر ریزنمونه در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف NAA و کینتین

Graph 4. Means of bulblet number per explant on the media containing different concentrations of NAA and kinetin



نمودار ٥- میانگین تعداد سوخک در نمونه در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف NAA و 2iP

Graph 5. Means of bulblet number per explant on the media containing different concentrations of NAA and 2ip

Gholami (2007) با استفاده از کشت ریزنمونه‌های گرفته شده از شاخساره‌های حاصل از رشد جوانه انتهایی سوخ گونه *F. imperialis* در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با دو میلی‌گرم در لیتر کینتین حداکثر سوخک به ازاء هر ریزنمونه تولید کردند. Roy و همکاران (۲۰۱۱) نیز در ارکیده واندا[1] مشاهده کردند که ۳/۸۸ µm از NAA در مقایسه با مقادیر بالاتر آن به حداکثر (۱۰/۲۲) تولید پروتوکورم[2] منجر شد. بنابراین با توجه به معایب استفاده از غلظت بالای تنظیم کننده رشد مذکور از جمله هزینه و احتمال جهش‌زایی که محققین دیگر نیز به آن اشاره کرده اند (Prang *et al.*, 2010) منطقی است که از مقدار پایین آن برای تولید سوخک در این گیاه استفاده شود.

1- Vanda

2- Protocorm

سوخک‌زایی مستقیم[1] و غیر مستقیم[2]

تولید سوخک در کشت درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های تهیه شده از سوخ به دو شکل مستقیم و غیرمستقیم و سپس ظهور جوانه و برگ‌های آغازین مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳).

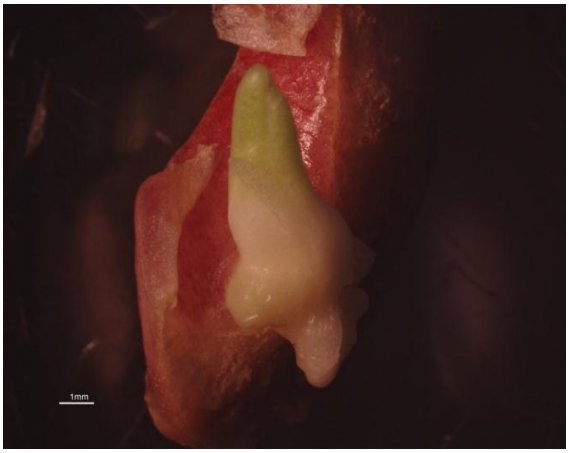
در باززایی مستقیم احتمال تغییرات سوماتیکی پایین است بنابراین برای اهداف تکثیر نباتات و برای تولید انبوهی از گیاهان در کوتاهترین زمان و با ژنوتیپ پایدار و شبیه به اصل روش سودمندی است ولی در باززایی غیرمستقیم احتمال تغییرات ژنتیکی زیاد می‌باشد که این روند نیز در به‌نژادی از طریق روش‌های غیرکلاسیک اجتناب ناپذیر است (Takagi *et al.*, 2011؛ Takeda et al., 2008).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تولید مستقیم سوخک، تحت تأثیر NAA، کینتین و اثر متقابل آن‌ها (جدول ۱) و نیز اثر متقابل NAA و 2ip (جدول ۲) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). تأثیر غلظت‌های مختلف2iP وNAA بر میانگین تعداد سوخک در هر ریزنمونه با روند مستقیم تشکیل سوخک در نمودار (۶) قابل مشاهده است و ملاحظه می‌شود که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر 2iP بیشترین تعداد تولید مستقیم سوخک را داشته است. مقایسه تأثیر تیمار اخیر در میانگین تعداد سوخک‌ها در هر ریز نمونه با سایر تیمارهای این گروه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است. تجزیه واریانس تولید سوخک در اثر سوخک‌زایی غیرمستقیم (جدول‌های ۱، ۲ و ۳) نشان می‌دهد که اثر NAA بر این صفت معنی‌دار (در سطوح ۱٪ و ۵٪) بود درحالی‌که تأثیر سیتوکینین‌های کینتین، 2ip و TDZ مورد استفاده در این آزمایش معنی‌دار نبود. با افزایش غلظت NAA میزان سوخک‌زایی غیرمستقیم افزایش یافت و در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان سوخک‌زایی غیرمستقیم مشاهده شد (نمودار ۷).

همان‌طور که می‌دانیم اکسین‌ها موجب تحریک و تسریع تقسیم سلولی و احتمال تغییرات ژنتیکی را موجب می‌شوند و NAA اکسین مصنوعی بسیار قوی است و ممکن است تأثیر نامطلوب ژنتیکی داشته باشد و از طرفی در این آزمایش تحریک سوخک‌زایی مناسبی با استفاده از ۰/۵ میلی گرم در لیتر از این اکسین (نمودارهای ۳، ۵ و ۶) مشاهده شد، با در نظر گرفتن عوامل زیست‌محیطی و هزینه مربوطه توصیه می‌شود که غلظت‌های پایین آن در القاء سوخک‌زایی به کار برده شود.

شکل ۲- تولید سوخک و گیاهک در اثر باززایی غیر مستقیم

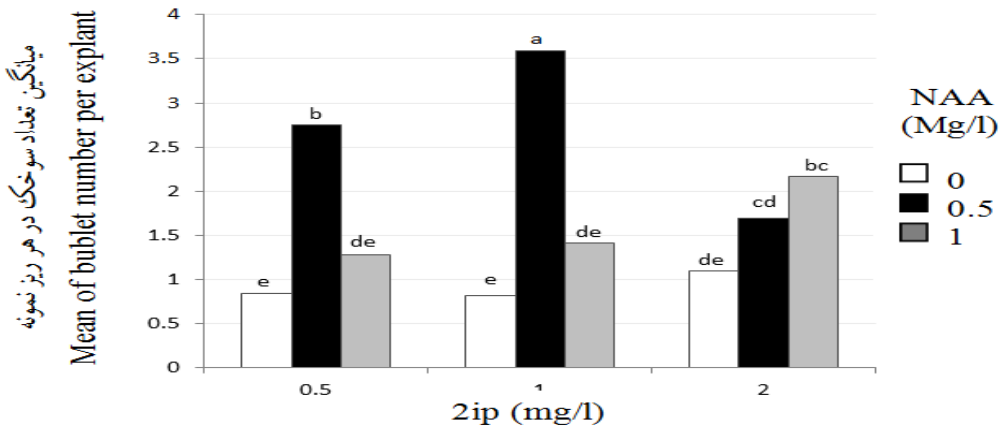
Fig. 2. Bulblet and plantlet formation via indirect regeneration



شکل ۳- تولید سوخک و جوانه سبز در اثر باززایی مستقیم

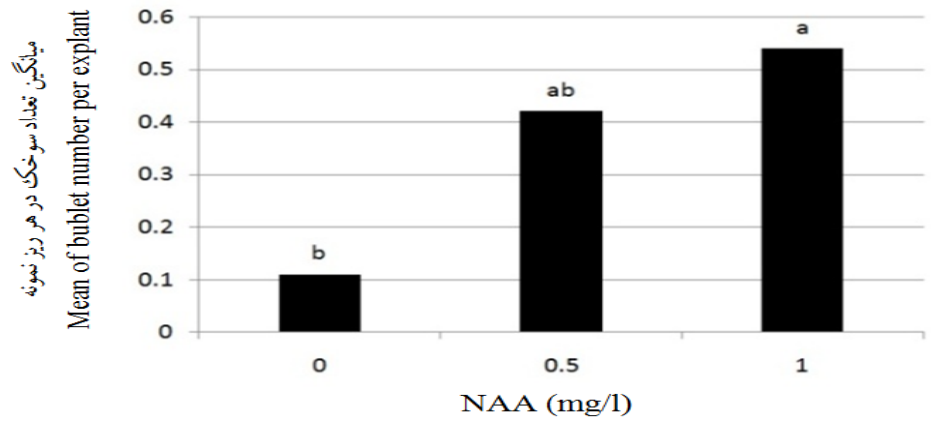
Fig. 3. Bulblet and green bud formation via direct regeneration

1- Direct bulblet regeneration
2- Indirect bulblet regeneration



نمودار ٦- تأثیر غلظت‌های مختلف NAA در ترکیب با 2iP بر میانگین تعداد سوخک (سوخک‌زایی مستقیم)

Graph 6. Effect of NAA and 2ip concentrations on the mean of bulblet number per explant (direct regeneration)



نمودار ۷- تأثیر NAA بر سوخک‌زایی غیرمستقیم

Graph 7. Effect of NAA on indirect bulblet regeneration

نتیجه‌گیری

لاله واژگون گیاه مهم بومی ایران و با کاربرد تزیینی و دارویی است اما هنوز رفتارهای رشد و نمو آن کاملاً شناخته شده نیست. نتایج این آزمایش و بررسی‌های سایر محققان نشان می‌دهد که می‌توان آن را مستقر و تکثیر کرد. پیشنهاد می‌شود که در زمینه‌های ژنتیک مولکولی دو همگروه، رشد و نمو و سازگاری گیاهچه‌ها تا مرحله گلدهی کامل، تأثیر سایر ترکیبات هورمونی در ریز ازدیادی، رفتار خواب و نیاز سرمایی و آغاز فعالیت دوباره رشد و نمو سوخک‌ها، تأثیر دما و دوره‌های دمایی بر رشد و نمو این گیاه تحقیق و بررسی بیشتری انجام گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از آقایان دکتر دادپور و دکتر مطلبی‌آذر که در نگارش مقاله و تحلیل داده‌ها ما را یاری فرمودند ابراز می‌نمایند.

References

1. Arora, R. and Bhojwani, S. 1989. In vitro propagation and low temperature storage

of Saussure alappa C.B. Clarke-anxiety endangered medicinal plant. Plant Cell Rep, 8: 44-47.

2. Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M., and Olzowska, O. 1988. Biotechnology of the micro propagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj, Y.P.S (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 4. Medicinal and aromatic plants I. Springer, Heidelberg, pp 15-18.

3. Chen, J. and Chang, W. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of Oncidium (Orchidaceae). Plant Science, 160 (2160): 87-93

4. Ebrahimie, E, Mohammadi-Dehcheshmeh, M, and Sardari, M, 2006. Fritillaria species are at the risk of extinction in Iran: study on effective factors and necessity of international attention. Hortscience, 41:1002.

5. Gholami, M. 2007. Micropropagation of persian fritillary (*Fritillaria imperialis* L.) clones, M.Sc. thesis, Buali Sina university. Scientific Documents and Information Center of Iran. (first 15 pages).

6. Khalighy, A. 1991. Floriculture, Iranian ornamental plants production. Roozbehan publication Inc. Tehran. Iran. 392 p.

7. Leeuwen, P.J., Trompert, J.P.T., and Weijden, J.A. 2002. The Forcing of *Fritillaria imperialis* L. Acta Horticulturae, 570: 165-169.

8. Mancuso, E., Bedini, G., and Peruzzi, L. 2012. Morphology, germination and storage behavior in seeds of Tuscan populations of Fritillaria montana (Liliaceae), a rare perennial geophytes in Italy. Turk Bot., 36: 161-166.

9. Metin, O.K., Turkas, M., Aslay, M., and Kaya, E. 2013. Evaluation of the genetic relationship between Fritillaria species from Turkey's flora using fluorescent-based AFLP. Turkish Journal of Biology, 37: 273-279.

10. Metzger, J. 1986. Hormones and reproductive development. In: Plant growth and development. Davis, P.J. Martinus Nigh (ed.), Boston, 15:68-74.

11. Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Ebrahimi, E., and Sardari, M. 2007. Indirect somatic embryogenesis from petal explants of endangered wild population of Fritillaria imperialis. Pakistan journal of Biological Sciences, 10(11): 1875-1879.

12. Nuth, D.T., Le, V.B., Teixeira da Silva, J.A, and Aswath, C.R., 2001. Thin cell layer culture system in Lilium: regeneration and transformation perspectives. In vitro Cellular Developmental Biology-plant, 37: 516-523.

13. Paek, K.Y. and Murphy, H.N. 2002. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of Fritillaria thunbergii. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68: 247-252.

14. Pierik, R.L.M. 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers.

Dordrecht Netherlands.

15. Prang, A.N.S., Bartsch, M., Serek, M., and Winkelmann, T. 2010. Regeneration of different cyclamen species via somatic embryogenesis from callus, suspension cultures and protoplasts. Sciatica Horticulture, 125: 442-450.

16. Rahimi, M., Daneshvar, M.H., Heidari, M., and Yari, F. 2013. In vitro micro propagation of Fritillaria imperialis L. through induction of indirect organogenesis. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(3): 418-424.

17. Rahman, A., Akhtar, M.N, Choudhary, M.I., Tsuday, S.B., Khalid, A., and Parvez, M. 2002. New steroidal alkaloids from fritillaria imperialis and their cholinesterase inhibiting activities. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 50(8): 1013-1016.

18. Roy, A.R., Patel, R.S., Patel, V.V., Sajeev, S., and Deka, B.C. 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of vanda coerulea Griffex. Lindl. (Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid. Sciatica Horticulture, 128: 325-331

19. Takagi, H., Sugawara, S., Saito, T., Tasaki, H., Yuanxue, L., Kaiyun, G., Han, D., Godo, T., and Nakano, M. 2011. Plant regeneration via direct and indirect adventitious shoot formation and chromosome-doubled somaclonal variation in Titanotrichum oldhamii (Hemsl.) Solereder. Plant Biotechnol Reports, 5:187-195.

20. Takeda, T., Mizukami, M., and Matsuoka, H. 2008. Characterization of two-step direct somatic embryogenesis in carrot. Biochemical Engineering Journal, 38: 206-211.

21. Witomska, M. and Lukaszewska, A. 1997. Bulblet regeneration in vitro from different explants of Fritillaria imperialis. Acta Horticulturae, 430: 331-338.