ریزازدیادی لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) از طریق روش باززایی غیرمستقیم در شرایط کشت درون شیشه‌ای

مجتبی رحیمی[1] و محمد حسین دانشور[2]*

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۲*- **نویسنده مسئول:** استاد، گروه باغبانی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان (mhdaneshvar2004@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۳۱

چکیده

ایران یکی از خاستگاه‌های لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) است. این گیاه زینتی در معرض انقراض می‌باشد. بنابراین افزایش آن از طریق کشت بافت ضروری است. این پژوهش در چهار آزمایش: تولید پینه، سوخک‌زایی، ریشه‌زایی و سازگاری انجام گردید. در آزمایش اول از دو ریزنمونه فلس و برگ اولیه در محیط کشت MS با غلظت های مختلف NAA و IBA اقدام به تولید پینه گردید. نتایج نشان داد بیشترین وزن پینه از ریزنمونه فلس در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید گردید. در آزمایش دوم از پینه های به‌دست آمده، در محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف TDZ و KIN، پس از ٦ و ۱۲ هفته، تعداد سوخک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، بیشترین تعداد سوخک بعد از ۱۲ هفته از پینه حاصل از ریزنمونه فلس در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و سپس در محیط کشت اندام زایی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN تشکیل شد. سپس سوخک‌ها به محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف NAA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) جهت ریشه‌زایی منتقل شدند. نتایج نشان داد، بیشترین تعداد ریشه از سوخک‌های حاصل از ریزنمونه برگ اولیه، در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. درنهایت سوخک‌های ریشه‌دار شده پس از شستشو با آب مقطر جهت سازگاری به گلدان‌های حاوی پرلیت،کوکوپیت، پرلیت و کوکوپیت که در اتوکلاو گندزدایی شده بودند، منتقل شدند. نتایج نشان داد سوخک‌های حاصل از ریزنمونه فلس در بستر کشت کوکوپیت، دارای بیشترین تعداد ریشه بود. این تحقیق نشان داد که استفاده از کشت بافت، نقش مهمی در جلوگیری از انقراض لاله واژگون دارد.

کلید واژه‌ها : باززایی غیرمستقیم، درون شیشه‌ای، سوخک، لاله واژگون، محیط کشت.

مقدمه

لاله واژگون (*Fritillaria imperialis* L.) یکی ازگیاهان در معرض انقراضی است که پتانسیل بسیار بالایی را به‌عنوان یک گیاه زینتی بسیار زیبا برای عرضه به بازار گل ایران و جهان دارد. این گیاه بومی ایران است و نیز دارای خاصیت دارویی بوده و از قسمت‌های مختلف این گیاه در تهیه داروهایی از جمله داروهای خلط‌آور[1] و ضدسرفه[2] و نیز داروهای موثر در کاهش فشار خون و قند خون استفاده می‌شود (Rahman *et al.*, 2002؛ Wang *et al.*, 2005).

لاله واژگون از زیبایی منحصر به فردی برخوردار بوده و دارای ویژگی‌هایی مناسبی چون بلند بودن ساقه گل‌دهنده، دوام گل‌بریدنی[3] و ظاهر شگفت‌انگیز است (Ozel and Erden, 2005). این گیاه در مناطق

1- Expectorant

2- Anti-tussive

3- Cut flower longevity

مرتفع کوهستانی رشته کوه‌های زاگرس از چهارمحال و بختیاری تا لرستان و کهکلویه و بویر احمد رویش دارد اما متاسفانه در جایگاه خود توسط اهالی بومی مورد بی‌مهری فراوان قرار گرفته و هر ساله میزان وسعت دشت‌هایی که در آن لاله واژگون رویش دارد کاسته می‌شود. بنابراین به‌منظور شناخت و حفظ و استفاده بهتر از این گیاه، ضروری است که در زمینه تکثیر آن مطالعات بیشتری صورت گیرد. روش سنتی تکثیر گیاهان سوخوار[1] از طریق اندام زیرزمینی مانند سوخ[2] و فلس می‌باشد سوخک که این روش‌ها هم کارایی پایین‌تری دارند و هم نیازمند مدت زمان طولانی (۵-۳ سال) برای تولید سوخ‌های با قابلیت گلدهی هستند. علت کارایی پائین این روش‌ها را می‌توان در تعداد کم فلس و در نتیجه آن کم بودن نقاط مریستمی جستجو کرد. همچنین از آنجا که تکثیر لاله واژگون از طریق بذر زمان‌بر بوده و نیاز به ۵ تا ۶ سال زمان نیاز دارد. همچنین به دلیل هتروزیگوتی بالا به‌طور معمول نتایج شبیه والدین نخواهند بود (De Hertogh and Lenard, 1993). بنابراین روش تکثیر از طریق کشت بافت می‌تواند به تکثیر سریع و در حد انبوه این گیاه کمک شایان توجهی بنماید. متاسفانه در تکثیر لاله واژگون از طریق کشت بافت به‌ویژه روش باززایی غیر مستقیم (همراه با فاز پینه) گزارشات کمی وجود دارد. Rahimi و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از ریزنمونه‌های فلس، برگ اولیه و گلچه لاله واژگون را از طریق کشت بافت به روش باززایی غیرمستقیم مورد بررسی قرار دادند و میزان قابل توجهی پینه و سوخک[3] را گزارش نمودند. Witomska and Lukaszewska (۱۹۹۷) ابتدا تعداد ۲۲ عدد سوخ *F. impereialis* رقم روبرا ماکسیما را به مدت دو سال در محیط کشت درون شیشه‌ای کشت نمود تا سوخک‌های کوچک ایجاد نمایند. سپس ریزنمونه هایی را از قسمت‌های مختلف گیاه آن گرفتند. درصد بالایی از ریزنمونه ها آلوده شده یا از بین رفتند. همچنین آن‌ها با کاربرد ریزنمونه‌های برگ، ساقه و نهنج اقدام به تکثیر این گیاه نمودند اما درصد باززایی از هر سه ریزنمونه، بسیار پائینی بود. *Salehzadeh* و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیقی گزارش نمودند که ریزنمونه فلس سنبل در محیط کشت پایه MS همراه با NAA بهترین نتیجه را در تشکیل پینه نشان داد. کشت بافت لاله واژگون گونه *Fritillaria hupehensis* به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مانند پمین[4]، پمنین[5]، ایمپرسین[6]، فورتیسین[7] و فریتیلاهوپین[8] نیز گزارش شده است (Chen *et al.*, 2000؛ Shiau *et al.*, 2000، Yang *et al.*, 2001).

با توجه به نزدیک شدن زمان انقراض این گیاه زیبا و بومی ایران، پژوهشی در راستای ریزافزایی سوخ لاله واژگون با استفاده از روش کشت بافت اجراء گردید. در این پژوهش با استفاده از ریزنمونه‌های فلس سوخ لاله واژگون و کشت آن‌ها در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) همراه با تنظیم کننده‌های مختلف رشد گیاهی تولید پینه، سوخک، ریشه و سازگاری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سوخ‌های گل لاله واژگون در مهرماه ۱۳۹۰ از چلگرد واقع در شمال غرب استان چهارمحال و بختیاری (۸۹ کیلومتری شمال غربی شهرکرد) جمع‌آوری گردید. در هنگام جمع‌آوری نمونه‌ها، سوخ‌های دارای ظاهر آلوده و نامطلوب و نیز دارای فلس چروکیده و بافت مرده، حذف گردیدند. پس از پیچاندن دور سوخ‌ها با دستمال کاغذی آن‌ها را در جعبه‌های پلاستکی مخصوص حمل میوه قرار داده شدند و به آزمایشگاه

1- Bulbous plants
2- Bulb
3- Bulblet

4- Pemine
5- Peiminine
6- Impericine
7- Forticine
8- Fritilla hupehin

تحقیقاتی کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، واقع در شهر ملاثانی انتقال یافتند. سوخ‌ها ابتدا با آب جاری شسته و خشک شدند. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها و عوامل بیماری‌زا به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در وایتکس تجاری[1] ۱۰ درصد گندزدایی سطحی گردیدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول قارچ‌کش بنومیل (۵ گرم در لیتر)، قرار داده شدند. در مرحله آخر سوخ‌ها سه بار با آب مقطر شستشو داده شده و بعد از قرار دادن در دمای آزمایشگاه روی سطح پارچه و خشک شدن سطحی فلس‌های بیرونی، تا زمان استفاده در سردخانه در دمای ۱±۴+ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد نگهداری شدند. ریزنمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق از فلس‌ها[2] و برگ‌های اولیه[3] جهت باززایی غیرمستقیم[4] استفاده شد. فلس‌های ضدعفونی شده در اندازه ۰/۷ × ۰/۷ سانتی‌متر به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه ریزنمونه سرآغازه برگ، جوانه وسط فلس‌های پیاز لاله واژگون در محیط کشت MS (بدون تنظیم‌کننده رشد) در اتاق رشد با رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در زیر نور فلورسنت با شدت نور ۲۰۰۰- ۱۵۰۰ لوکس قرار داده شدند. تا برگ اولیه ظاهر گردد. پس از ۱۲ روز که ارتفاع برگ اولیه به حدود ۱۰ سانتی‌متر رسید، آن را در اندازه‌های ۳ × ۳ میلی‌متر تبدیل و به‌عنوان ریزنمونه برگ اولیه مورد استفاده قرار گرفتند.

گندزدایی ریزنمونه فلس

۱- قرار دادن ریزنمونه‌های فلس در الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ۲- قرار دادن در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl) ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ۳- شستشو با آب مقطر استریل شده به مدت ۳ تا ۴ دقیقه، این مرحله بلافاصله سه مرتبه تکرار گردید.

گندزدایی جوانه میانی به‌منظور تهیه ریزنمونه برگ اولیه

۱- قرار دادن جوانه میانی در الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه۲- قرار دادن جوانه میانی در محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl) ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ۳- شستشو با آب مقطر استریل شده به مدت ۳ تا ۴ دقیقه، این مرحله بلافاصله سه مرتبه تکرار شد. لازم به ذکر است پس از گندزدایی و رشد برگ اولیه از مواد گندزدایی استفاده نگردید. این پژوهش در چهار آزمایش به ترتیب تولید پینه، سوخک زایی، ریشه‌زایی و سازگاری انجام گردید.

آزمایش اول: تولید پینه

آزمایش تولید پینه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با تیمارهای نوع ریزنمونه (فلس و برگ اولیه) و همچنین نوع محیط کشت در ۹ سطح شامل: ۱- ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ۲) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA ۳) یک میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA ۴) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA ۵) یک میلی‌گرم در لیتر NAA ۶) دو میلی گرم در لیتر NAA ۷) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ۸) یک میلی گرم در لیتر IBA ۹) دو میلی‌گرم در لیتر IBA هر آزمایش با ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۵ شیشه کشت) انجام گرفت. پس از تولید پینه، وزن پینه (از اختلاف وزن شیشه حاوی پینه و فاقد پینه) با ترازوی دیجیتال یادشت برداری گردید.

آزمایش دوم: باززایی از پینه و تولید سوخک

پس از این که پینه تولید شده وزن گردید در زیر دستگاه جریان هوای استریل که قبلاً کاملا با الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی گردیده بود به تکه‌های (۲ × ۲ میلی‌متر) تقسیم گردیدند و در محیط‌های کشت که جهت باززایی تهیه شده بود، منتقل شدند. این آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای شامل نوع پینه (فلس و برگ اولیه)

1- Sodiumhypochlorite(NaOCl)
2- Scale
3- Primordia leaf
4- Indirect regeneration

و نوع محیط کشت اندام‌زایی با ۹ تیمار شامل: ۱) ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیترTDZ همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر KIN ۲) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN ۳) یک میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با یک میلی‌گرم در لیتر KIN ۴) ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ ۵) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ ۶) یک میلی‌گرم در لیتر TDZ ۷) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN ۸) یک میلی‌گرم در لیتر KIN ۹) دو میلی‌گرم در لیتر KIN، همچنین نوع محیط کشت القاء پینه با ۴ تیمار شامل: ۱) ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ۲) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA ۳) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA ۴) یک میلی‌گرم در لیتر NAA. به دلیل مقدار کم تولید پینه در محیط‌های کشت دیگر تولید پینه، تنها از پینه حاصل از این چهار محیط کشت جهت اندام‌زایی استفاده گردید. و هر تیمار شامل ۳ تکرار (هر تکرار ۵ شیشه کشت) انجام شد. شاخص مورد بررسی در این آزمایش تعداد سوخک بوده است.

آزمایش سوم: ریشه‌زایی سوخک‌ها

به‌منظور ریشه‌زایی سوخک‌های به‌دست آمده از آزمایش قبل، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای شامل نوع سوخک (فلس و برگ اولیه) و ۴ غلظت NAA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ۴ تکرار (هر تکرار شامل ۵ شیشه کشت) انجام گرفت. شاخص‌های مورد بررسی در این آزمایش طول ریشه (با استفاده ار خط‌کش) وتعداد ریشه بود.

آزمایش چهارم: سازگاری سوخک‌های ریشه‌دار شده

به‌منظور سازگار نمودن سوخک‌های ریشه‌دار شده، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهایی شامل نوع سوخک ریشه‌دار شده (فلس و برگ اولیه) و بستر کشت (پرلیت، کوکوپیت و پرلیت همراه باکوکوپیت) با سه تکرار (هر تکرار، یک گلدان به حجم ۰/۵ لیتر) انجام گرفت. شاخص‌های مورد بررسی در این آزمایش قطر سوخک (با استفاده از کولیس) و طول ریشه بود. در تمامی آزمایش‌های فوق تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار MSTAT-C و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. به‌منظور تولید پینه، محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه در قفسه‌های اتاق رشد نگهداری و با کیسه‌های سیاه رنگ پلی اتیلن پوشانیده شدند. جهت تولید سوخک و ریشه محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد در اتاقک رشد با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. دوره رشد پینه و سوخک‌زایی در اتاق رشد چهار هفته بود. ریزنمونه‌ها بعد از چهار هفته در زیر دستگاه جریان هوا به محیط کشت جدید منتقل گردیدند.

نتایج و بحث

تولید پینه

بررسی نتایج برهمکنش نوع ریزنمونه و محیط کشت پایه MS همراه با تنظیم کننده رشد نشان داد بیشترین وزن پینه (۳/۲۹ گرم) در محیط‌کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA از ریزنمونه فلس بدست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از وزن پینه در سایر تیمارها بود. کمترین وزن پینه در تیمار محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA از هر دو ریزنمونه برگ و فلس تولید گردید (جدول ۱). این نتایج باگزارش رحیمی و همکاران (۲۰۱۲) در مورد باززایی غیر مستقیم لاله واژگون مطابقت دارد. اکسین به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم‌کننده رشد گیاهی در ارتباط با تقسیم سلولی، تمایز، جنین‌زایی و همچنین القاء پینه در نظر گرفته می‌شود. البته برای تحریک تشکیل پینه، اضافه کردن تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (نوع، غلظت و نسبت اکسین به سیتوکنین) تا حد

زیادی بستگی به ژنوتیپ و مقدار هورمون‌های موجود در محیط کشت دارد (Daneshvar, 1992). شکل (۱ و ۲) مراحل پینه‌زایی را در ریزنمونه فلس و برگ اولیه را نشان می‌دهند.

سوخک‌زایی از پینه

نتایج برهمکنش سه عامل نوع پینه، نوع محیط‌کشت القاء پینه و محیط‌های کشت سوخک‌زایی بر تعداد سوخک لاله واژگون نشان داد بالاترین تعداد سوخک (۱۸/۳۳ عدد) از پینه ریزنمونه فلس از محیط‌کشت پایه MS تولید پینه همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط کشت اندام‌زایی همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ تولید گردید و تفاوت معنی‌داری با پینه ریزنمونه فلس از محیط‌کشت تولید پینه همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط‌کشت اندام‌زایی همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ نداشت ولی با سایر تیمارها افزایش معنی‌داری را نشان داد. کمترین تعداد سوخک (۰/۳۳ عدد) از پینه ریزنمونه برگ اولیه از محیط کشت MS تولید پینه همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت سوخک‌زایی همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ تولید گردید. شکل (۳) سوخک‌زایی از پینه ریزنمونه فلس و برگ اولیه را نشان می‌دهد. Kim و همکاران (۱۹۸۱) گزارش دادند که بعد از تولید پینه از جوانه‌های نابالغ گل سنبل، با زیرکشت کردن این پینه در محیط‌کشت MS همراه با BAP در دو غلظت ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر همراه با NAA در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر در روشنایی به مدت ۶ هفته تولید سوخک را مشاهده کردند. Salehzadeh و همکاران (۲۰۰۸) از پینه تولید شده از فلس سنبل در محیط‌کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط‌کشت اندام‌زایی شامل محیط‌کشت پایه MS همراه با ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد سوخک را به دست آوردند.

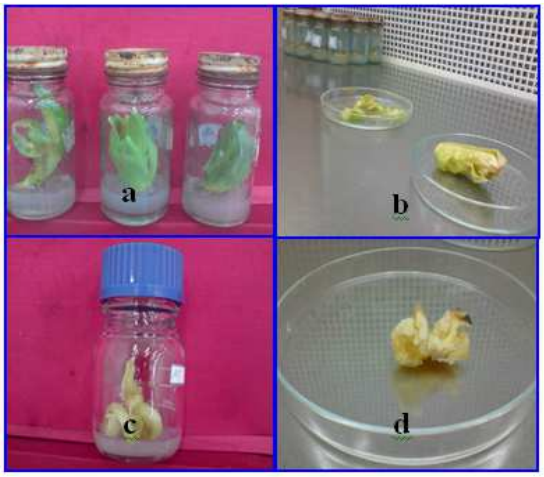
جدول ۱- اثر متقابل محیط کشت پایه MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA و NAA و نیز نوع ریزنمونه بر وزن پینه

Table 1. Interaction basal MS medium with plant growth regulators IBA and NAA and kind of explants on callus weight

ریزنمونه برگ اولیه Leaf primordial	ریزنمونه فلس Scale Explants	محیط کشت پایه MS (میلی‌گرم در لیتر) Basal MS medium (mg/l)
2.76^{b}	2.10^{c}	NAA 0.25 + IBA 0.25
1.98^{cd}	3.29^{a}	NAA 0.5 + IBA 0.5
0.45^{fg}	0.45^{fg}	NAA 1.0 + IBA 1.0
1.34^{e}	1.73^{d}	NAA 0.25
1.01^{f}	2.21^{c}	NAA 0.5
0.11^{h}	0.19^{h}	NAA 1.0
0.02^{h}	0.01^{h}	IBA 0.5
0.006^{h}	0.10^{h}	IBA 1.0
0.01^{h}	0.006^{h}	IBA 2.0

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

In each column mean that the letters are the same at 5% Duncan test significantly different from one another.

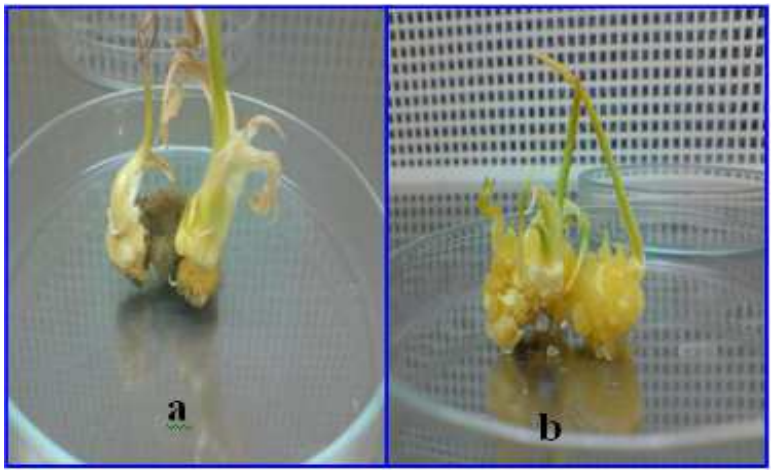


شکل ۱- تولید پینه از ریزنمونه برگ اولیه (a- تشکیل برگ اولیه از جوانه میانی فلس، b- تکه نمودن برگ اولیه به‌عنوان ریزنمونه، c- متورم شدن ریزنمونه و d- تشکیل پینه).

Fig 1. Callus of leaf explants of (a- initial leaf formation of the central bud scales, b- piece of primary leaf as explants, c- swell explants d- callus formation).

شکل ۲- تولید پینه از ریزنمونه فلس (a- تکه‌های فلس به‌عنوان ریزنمونه، b- تشکیل پینه بعد از ٤ هفته، c- تشکیل پینه بعد از ٦ هفته و d- پینه همراه با تشکیل سوخک و شاخساره).

Fig 2. Production of callus from explants Scales (a- scaly patches as explants, b- callus formation after 4 weeks, c- callus formation after 6 weeks d- callus formation with the formation of bulblets and shoot).



شکل ۳- سوخک‌زایی از پینه (a- ریزنمونه فلس و b- ریزنمونه برگ اولیه).

Fig 3. bulblets callus from induction a. scale explants b- primary leaf explants).

تولید سوخک پس از ۱۲ هفته

بررسی اثر متقابل نوع پینه، محیط‌کشت تولید پینه و محیط‌کشت سوخک‌زایی بر تعداد سوخک نشان دادند که بالاترین تعداد سوخک (۲۵ عدد) از پینه حاصل از ریزنمونه فلس در محیط‌کشت MS تولید پینه، حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط‌کشت پایه MS اندام‌زایی همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN تشکیل گردید که افزایش معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد (جدول ۲).کمترین تعداد سوخک (۰/۳۳) از پینه ریزنمونه برگ در محیط‌کشت پایه MS تولید پینه همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط‌کشت پایه MS سوخک‌زایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید گردید. Simmonds and Cumming

(۱۹۷۶) گزارش داد بهترین اندام‌زایی سوخک گل سوسن از پینه را در محیط‌کشت پایه MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در شرایط روشنایی به دست آورد. Hussy (۱۹۷۵) با انتقال پینه به‌دست آمده از محیط‌کشت پایه MS همراه با تشکیل پینه که با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، به محیط‌کشت پایه با غلظت بسیار کم ۰/۱۲-۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و یا بدون NAA انتقال و در مدت ۸-۶ هفته از گیاه سنبل سوخک تولید کردند.

ریشه‌زایی سوخک‌های تولید شده

تعداد ریشه

نتایج اثر برهمکنش ریزنمونه و محیط کشت MS همراه با غلظت های مختلف NAA بر تعداد ریشه نشان داد بالاترین تعداد ریشه (۷/۷ عدد) از سوخک ریزنمونه برگ اولیه در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین ریشه (۱/۱ عدد) از سوخک‌های هر دو ریزنمونه در محیط کشت پایه MS بدون هر دو ریزنمونه در محیط کشت پایه MS بدون تنظیم‌کننده رشد NAA بوده که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد (نمودار ۱). در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، تعداد ریشه سوخک‌های حاصل از ریزنمونه برگ اولیه افزایش معنی‌داری نسبت به تعداد ریشه سوخک‌های حاصل از ریزنمونه فلس را نشان دادند. Nhut (۱۹۹۸) سوخک‌های سوسن را به محیط‌کشت پایه نیم غلظت MS همراه با ۱/۱ میکرومولار NAA منتقل نمود و بیشترین ریشه‌زایی را در این محیط‌کشت گزارش نمود. Danut and Bhojwani (۱۹۹۵) گزارش نمود شاخه‌های حاصل از جوانه‌های جانبی پداژه گلایول در محیط‌کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد ریشه را نشان داد. اما بیشترین ریشه‌زایی سوخک‌های لاله واژگون را در محیط‌کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA گزارش نمود (Mohammadi-Dehcheshmeh *et al.*, 2008).

جدول ۲- اثر متقابل نوع پینه و نوع محیط کشت تولید پینه و محیط‌های کشت سوخک‌زایی بر تعداد سوخک پس از مدت ۱۲ هفته

Table 2: Interaction of Callus and Callus medium and medium bulblets the number of bulblets after 12 weeks

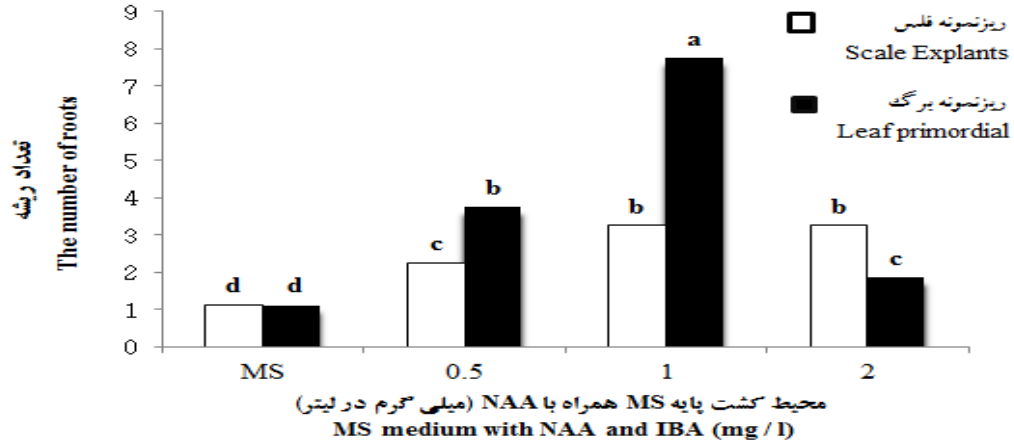
محیط کشت پایه MS تولید پینه همراه با NAA و IBA (میلی‌گرم در لیتر) Callus MS medium with NAA and IBA (mg/l)				محیط کشت (MS) سوخک‌زایی (میلی‌گرم در لیتر) MS medium bulblets induction (mg/l)	نوع پینه Callus
NAA1.0	NAA0.5	NAA0.5 +IBA0.5	NAA 0/25+IBA 0/25		
10.33^{lmn}	22.33^{b}	15.67^{g}	18.67^{de}	TDZ 0.25 + KIN 0.25	فلس Scale
12.33^{ijk}	25.00^{a}	13.33^{hi}	17.00^{fg}	TDZ 0.5 + KIN 0.5	
6.67^{rst}	9.67^{mno}	8.33^{opq}	11.00^{klm}	TDZ 1.0+ KIN 1.0	
8.00^{pqr}	20.33^{c}	11.33^{jkl}	19.67^{cd}	TDZ 0.25	
9.00^{n-q}	17.33^{ef}	10.33^{lmn}	20.00^{bc}	TDZ 0.5	
4.67^{vwx}	11.67^{jkl}	8.33^{opq}	10.33^{lmn}	TDZ 1.0	
4.67^{vwx}	12.00^{ijk}	5.67^{tuv}	12.67^{hij}	KIN 0.5	
5.33^{t-w}	14.00^{h}	8.33^{opq}	13.33^{hi}	KIN 1.0	
3.00^{y}	10.33^{lmn}	3.00^{y}	9.00^{n-q}	KIN 2.0	
5.33^{t-w}	7.67^{qrs}	4.67^{vwx}	7.67^{qrs}	TDZ 0.25 + KIN 0.25	برگ اولیه Leaf primordial
4.00^{w-y}	3.67^{xy}	6.66^{stu}	8.00^{pqr}	TDZ 0.5 + KIN 0.5	
2.50^{z}	2.00^{z}	0.43^{z}	4.33^{v-y}	TDZ 1.0+ KIN 1.0	
5.33^{t-w}	5.33^{t-w}	5.00^{u-x}	9.33^{nop}	TDZ 0.25	
4.00^{w-y}	3.00^{y}	2.00^{yz}	9.67^{mno}	TDZ 0.5	
1.67^{z}	0.43^{z}	0.67^{z}	5.00^{u-x}	TDZ 1.0	
2.00^{yz}	1.33^{z}	1.33^{z}	6.67^{rst}	KIN 0.5	
2.00^{yz}	5.33^{t-w}	2.00^{yz}	6.67^{rst}	KIN 1.0	
2.00^{yz}	1.67^{z}	0.33^{z}	8.00^{pqr}	KIN 2.0	

در هر ستون میانگین هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

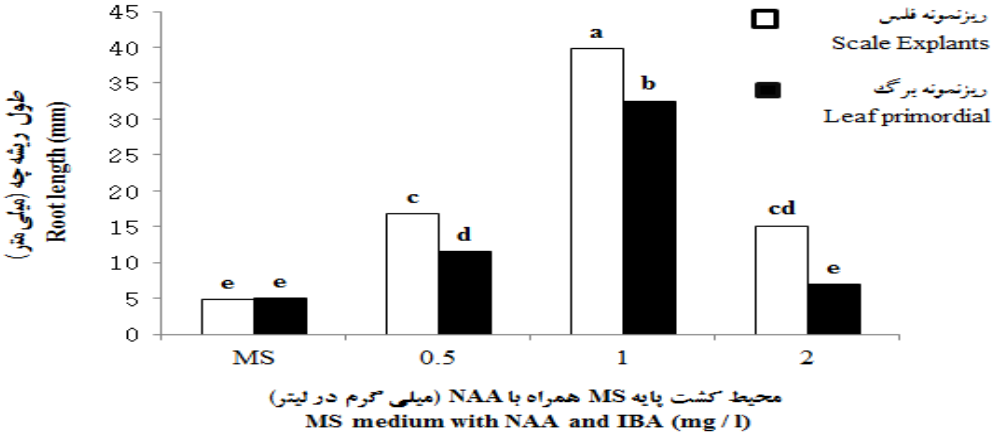
In each column mean that the letters are the same at 5% Duncan test significantly different from one another.

طول ریشه

بررسی اثر برهمکنش ریزنمونه و محیط کشت MS همراه باNAA بر طول ریشه نشان داد بالاترین طول ریشه (۳۹/۸ میلی‌متر) از سوخک‌های ریزنمونه فلس در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بوده که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشته است. کمترین طول ریشه (۴/۸ میلی‌متر) در سوخک‌های حاصل از ریزنمونه فلس درتیمار شاهد (محیط کشت MS بدون NAA) تولید گردید که تفاوت معنی‌داری با طول ریشه در سوخک‌های ریزنمونه برگ اولیه در محیط‌کشت شاهد و محیط‌کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان نداد (نمودار ۲). این نتایج با نتایج Kim و همکاران (۱۹۸۱) که سوخک‌های گل سنبل را در محیط‌کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین تعداد ریشه را تولید کردند و همچنین گزارش کردند که سوخک‌های حاصل از ریزنمونه برگ دارای بالاترین تعداد ریشه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بوده است مطابقت دارد. به نظر می‌رسد استفاده از اکسین به‌عنوان محرک تشکیل ریشه با توجه به تحقیقات انجام شده نقش بسزایی داشت و این بررسی‌ها نتایج به‌دست آمده را تأیید می‌نمایند.



نمودار ۱- اثر متقابل نوع ریزنمونه و محیط کشت MS همراه با غلظت های مختلف NAA بر تعداد ریشه.
Fig 1. Interaction of explants and MS medium with different concentrations of NAA on root number.



نمودار ۲- اثر متقابل نوع ریزنمونه ومحیط کشت پایه MS همراه باغلظت‌های مختلف NAA بر طول ریشه.
Fig 2. Interaction of explants and MS medium with different concentrations of NAA on root length.

سازگاری

قطر سوخک

بررسی اثر برهمکنش بستر کشت و ریزنمونه بر قطر سوخک نشان داد سوخک‌های حاصل از ریزنمونه فلس در بستر کشت کوکوپیت دارای بالاترین میزان قطر (۲۸/۷۵ میلی‌متر) هستند (جدول ۳). Nhut و همکاران (۲۰۰۱) سوخک‌های ریشه‌دار شده سوسن عید پاک[1] بعد از ۲ ماه سازگاری در محیط کشت پرلیت همراه با کوکوپیت همراه حفظ رطوبت به گلخانه منتقل نمودند.

طول ریشه

موفقیت در انتقال سوخک بستگی به شرایط طبیعی (خاک) و سیستم کامل و کافی ریشه دارد (Santos *et al.*, 2002؛ *Squires et al.*, 1991). یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که سیستم کامل و کافی ریشه در بستر کشت کوکوپیت حاصل گردید، در این بستر بالاترین طول ریشه نسبت به دو بسترهای پرلیت و کوکوپیت همراه با پرلیت بوده است مشاهده گردید (جدول ۳).

طول شاخساره

بررسی اثر برهمکنش بستر کشت و ریزنمونه بر طول شاخساره نشان داد سوخک‌های ریزنمونه فلس ریشه‌دار شده در بستر کشت مخلوط کوکوپیت و پرلیت دارای بالاترین طول شاخساره (۳۳/۵ میلی‌متر) بوده‌اند که تفاوت معنی‌داری با سایر بسترهای کشت نشان داد (جدول ۳).

انتقال به خاک

بعد از این‌که گیاهان در بسترهای کشت پرلیت، کوکوپیت همراه با پرلیت و کوکوپیت سازگاری یافتند، به گلدان‌های حاوی خاک در بیرون از گلخانه و در شاسی سرد انتقال داده شدند.

جدول۳- اثر متقابل نوع ریزنمونه و بستر کشت بر قطر سوخک، طول شاخساره و طول ریشه

Table 3. Interaction of explants and culture medium bulblets diameter, length of shoot and root length

نوع ریزنمونه Explant	بستر کشت Medium	قطر سوخک (میلی‌متر) Bulblet diameter (mm)	طول شاخساره (میلی‌متر) Shoot length (mm)	طول ریشه (میلی‌متر) Root length (mm)
فلس Scale	پرلایت Perlite	13.8^{d}	10.75^{d}	12.50^{e}
	پرلایت + کوکوپیت Perlite + Cocopeat	22.39^{b}	33.55^{a}	21.50^{c}
	کوکوپیت Cocopeat	28.75^{a}	21.77^{b}	31.50^{a}
برگ اولیه Leaf primordial	پرلایت Perlite	11.66^{e}	10.00^{d}	10.75^{f}
	پرلایت + کوکوپیت Perlite + Cocopeat	15.48^{c}	22.00^{b}	18.75^{d}
	کوکوپیت Cocopeat	22.37^{b}	16.50^{c}	29.25^{b}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان هستند در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

In each column mean that the letters are the same at 5% Duncan test significantly different from one another.

1- *Lillium longiflorum*

نتیجه‌گیری

در آزمایش تولید پینه، ریزنمونه‌های فلس کشت شده در محیط کشت پایه MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA دارای بالاترین تولید پینه بوده‌اند که بهترین تیمار در این آزمایش بوده است و با افزایش میزان اکسین مقدار تولید پینه کاهش یافته است به‌طوریکه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر از هر دو اکسین مقدار پینه بسیار کاهش یافته است. در آزمایش سوخک‌زایی از پینه ها، بهترین تیمار غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بوده است و با افزایش میزان TDZ میزان سوخک‌زایی نیز کاهش یافته است. نتایج نشان داد بهترین تیمار پس از ۱۲ هفته تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN بوده است و در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN سوخک‌زایی بسیار پایین بوده است. در آزمایش ریشه‌زایی، بیشترین ریشه‌زایی صورت گرفته در محیط کشت پایه MS همراه با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA بوده است و در محیط کشت فاقد تنظیم کننده رشد اکسین ریشه‌زایی صورت نگرفته است. در آزمایش سازگاری، سوخک‌های حاصل از ریزنمونه فلس در بستر کشت کوکوپیت دارای بالاترین میزان قطر بودند. بستر کشت کوکوپیت بهترین بستر کشت در این آزمایش بوده است.

این تحقیق نشان داد گیاه زینتی بسیار زیبا و در معرض انقراض لاله واژگون کاملاً مستعد تکثیر از طریق کشت بافت می‌باشد.

References

1. Chen, U.C., Tai, C.D., Chen, C.C., and Tsay, H.S. 2000. Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis*. Influence of medium component and light treatment on *in vitro* rooting and acclimatization on bulblet. Journal of Agricultural Research China, 49(4): 48-55.

2. Daneshvar, M.H. 1992. Callus induction and organogenesis in cultivar of peach (*Prunus persica* L.). Ph.D. Thesis, Department of Agriculture and Horticulture Faculty of Agricultural and Food Sciences. University of Nottingham Sutton Bonington, UK, 329 P.

3. Danut, P.K. and Bhojwani, S. S. 1995. *In vitro* corm formation and field evaluation of corm- derived plants of gladiolus. Scientia Horticulture, 61: 115-129.

4. De Hertogh, A. and Lenard, M. 1993. The physiology of flower bulbs. Elsevier, pp. 718-739.

5. Hussy, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of Liliaceae, Iridaceae and Amarylidaceae. Journal of Experimental Botany, 26: 645-647.

6. Kim, Y.J., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. 1981. In vitro propagation of Hyacinth. Hort Science, 16(5): 645-647.

7. Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M., and Ebrahimie, E. 2008. Petal: A reliable explant for direct bulb let regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. Acta Physiologiae Plantarum, 30: 395-399.

8. Nhut, D.K. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Reports, 17: 913-916.

9. Nhut, D.T., Le, B., Tanaka, M., and Van, T.T. 2001. Shoot inducation and plant regeneration from receptacle tissue of *Lilium longiflorom*. Scientia Horticulture, 87: 131-138.

10. Ozel, A. and Erden, K. 2005. Determination of some morphological properties of *Fritillaria imperialis* L. and F. *persica* L. Fourth Congress of Agriculture in Southeast Anatolia Project Areas, 1562-1567.

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

12. Rahman, A.U., Akhtar, M.N., Choudhary, M.I., Tsuda, Y., Sener, B., Khalid, A., and Parviz, M. 2002. New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 50: 1013-1016.

13. Salehzadeh, S.H., Daneshvar, M.H., and Moallemi, N. 2008. Indirect organogenesis from scale, leaf primordia and immature floret explant of hyacinth (*Hyacinthus orientalis* L.). American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 4(5): 640-645.

14. Santos, A., Fidalgo, F., Santos, I., and Salema, R. 2002. In vitro bulb formation of *Narcissus asturiensis*, a threatened species of the Amaryllidaceae. International Journal of Horticultural Science and Technology, 77: 149-152.

15. Shiau, Y.J., Tai, C.D., Chen, C.C., and Tsay, H.S. 2000. Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hosiaoet K.C. Hsia. I. The induction of bulb scale and embryogenic callus from different source explant. Journal of Agricultural Research of China, 49(4): 29-38.

16. Simmonds, J.A. and Cumming, B.G. 1976. Propagation of *Lilium hybrids*. Production of plantlets from bulb-scale callus culture for increased propagation rate. Scientia Horticulture, 5: 161-170.

17. Squires, W.M., Langton, F.A., and Fenlon, J.S. 1991. Factors influencing the transplantation success of micropropagated Narcissus bulbil. Journal of Horticultural Science, 66: 661-671.

18. Wang, S.H., Gaoa, W., Chena, H., and Xiao, P. 2005. New starches from *Fritillaria* species medicinal plants. Carbohydrate Polymer, 61: 111-114.

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

20. Yang, S.R. Tai, C.D., Chen, C.C., and Tsay, H.S. 2001. Effect of plant growth regulators and status of the medium on induction and proliferation of protocorm-

like-bodies and bulblet from bulb scale culture of *Fritillaria hupehensis*. Hsiao ET. K. C. Hsia, Journal of the Agricultural Association of China, 5: 414-422.