تأثیر امواج فراصوت و تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل‌آدنین و نفتالین استیک اسید بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Boiss.)

زهرا عظیم‌زاده[۱]، مهدی محب الدینی[۲]*، اسماعیل چمنی[۳] و ملیحه عرفانی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- ***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (mohebodini@uma.ac.ir)

۳- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- دانشجوی دکتری علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۷

چکیده

سوسن چلچراغ از گونه‌های خودروی جنس سوسن است که در بخش‌های شمالی ایران می‌روید. این گونه به‌عنوان یک گل جدید، دارای ارزش زینتی و پتانسیل اقتصادی بالایی، جهت عرضه در بازار جهانی می‌باشد. استفاده از روش‌های کشت بافت می‌تواند امکان تولید گیاه را در سطح وسیع از تعداد کم نمونه میسر سازد. کاربرد فراصوت به‌عنوان یک محرک فیزیکی به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد به‌عنوان محرک شیمیایی می‌تواند در تکثیر این گیاه مؤثر باشد. بدین منظور ریزنمونه‌های فلس این گیاه پس از قرارگیری در حمام فراصوت، در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف NAA و BA به تنهایی و یا به‌صورت ترکیب با یکدیگر کشت گردیدند. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی و با چهار تکرار صورت گرفت. نتایج نشان داد که در ترکیب‌های تیماری صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۱۰ ثانیه و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر، ۵، ۲۰ و ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی بیشترین تعداد پیازچه را نسبت به شاهد داشتند. محیط کشت MS حاوی تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت دارای بیشترین تعداد پیازچه‌های باززایی شده بود. با این حال ترکیب تیماری ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت نیز ضمن داشتن تعداد پیازچه‌ی زیاد، پیازچه‌های درشت‌تری نیز داشت. بنابراین به نظر می‌رسد تیمار فراصوت در ترکیب با هورمون در محیط کشت بافت در تحریک پیازچه‌زایی در ریزنمونه فلس مؤثر است.

کلید واژه‌ها: پیازچه، ترکیب هورمونی، تکثیر درون‌شیشه‌ای، ریزنمونه، فلس

مقدمه

سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium ledebourii* Boiss. گیاهی از تیره‌ی Liliaceae (Gasemi-Gahsareh and Kafi, 2006) و از کمیاب‌ترین گونه‌های سوسن است که بیشتر در ناحیه‌ی قفقاز می‌روید (Padashe-Dehkaii *et al.*, 2006). ایران یکی از مهم‌ترین مناطق پراکنش سوسن چلچراغ در مقاومت زیاد به سرما و عطر زیاد است و به‌عنوان یک گل جدید، دارای ارزش زینتی و پتانسیل اقتصادی بالایی جهت عرضه در بازارهای جهانی می‌باشد (Jin *et al.*, 2012). سوسن چلچراغ دارای پیاز تخم مرغی یا کروی پوشیده از فلس‌های متمایل به زرد و سرنیزه‌ای است. این گیاه ساقه‌ی بلند و ضخیم به ارتفاع ۱۵۰-۵۰ سانتی‌متر دارد که در تمام طول سال پوشیده از برگ‌های متراکم ایستاده و در بخش فوقانی تقریباً کم‌برگ است (Farsam *et al.*, 2003؛ Ekrami, 1980). این گیاه

دارای گل‌های سفید و بزرگ است که گل‌ها به‌طور واژگون قرار داشته و روی حاشیه‌ی گلبرگ‌ها، با لکه‌های برجسته به رنگ قهوه‌ای مزین شده است. هر گل دارای ۶ گلبرگ‌نما و ۶ پرچم بوده و گل‌ها دارای عطر هستند (Gasemi-Gahsareh and Kafi, 2006).

سوسن چلچراغ به دلیل وحشی بودن و تنوع ژنتیکی ناشی از تکثیر جنسی آن و کارایی پایین روش‌های معمول تکثیر رویشی، همچنین احتمال انقراض آن‌ها در منطقه رویش خود به دلیل برداشت در سطح زیاد، نیازمند استفاده از تکنیک‌های مناسب تکثیر به روش کشت بافت می‌باشد. کشت درون شیشه‌ای به چندین عامل از قبیل محیط کشت، شرایط نوری، غلظت‌ها و ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد، سایر عناصر محیط کشت و نوع ریزنمونه بستگی دارد (Arzate-Fernandez *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد جدا کردن فلس از پیاز مادری و تمایزیابی پیازچه، به وسیله‌ی دخالت در میزان هورمون‌های گیاهی چون اکسین و سایتوکاینین تحت تأثیر قرار گیرد (Meamare-Moshrefi *et al.*, 2005). سطوح هورمون درون‌زای گیاهی، نقش مهمی را در اندام‌زایی و نمو درون‌شیشه‌ای گیاه بازی می‌کند و نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که سطوح هورمون درون‌زاد می‌تواند از طریق هردو تنش زیستی و غیرزیستی تنظیم شود (Tatari-Varnousefaderani *et al.*, 2007). از جمله تنش‌های محیطی غیر زیستی می‌توان به امواج فراصوت اشاره نمود. امواج فراصوت، فرکانس‌های صوتی در محدوده‌ی غیر شنیداری برای انسان (معمولاً از ۱۰۰-۲۰ کیلوهرتز) هستند. تحریک به وسیله‌ی فراصوت می‌تواند رشد و تکثیر بافت‌ها یا سلول‌ها را تحریک و یا بازدارد. زمان تحریک نیز نقش مهمی را در این زمینه بازی می‌کند (Liu *et al.*, 2003). همچنین فرکانس و مقدار انرژی مورد نیاز برای تأثیر تیمار فراصوت، به‌طور گسترده بین گونه‌ها و ارقام متغیر است. تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی تأثیر امواج فراصوت به‌عنوان یک فناوری فیزیکی محرک بر ریزازدیادی سوسن چلچراغ انجام نشده است. با توجه به اهمیت افزایش پیاززایی در کشت بافت سوسن چلچراغ، کاربرد فراصوت به‌عنوان یک محرک فیزیکی به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد به‌عنوان محرک شیمیایی، در صورت مؤثر بودن بر ریزازدیادی سوسن چلچراغ، می‌تواند در تکثیر این گیاه و توسعه‌ی مناطق رویشی آن مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در قالب ۴ آزمایش جداگانه طراحی و اجرا گردید. آزمایش‌ها با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد (BA و NAA) و یک تنش محیطی غیر زیستی (فراصوت) به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در سال۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. آزمایش اول شامل دو فاکتور BA و NAA، آزمایش دوم شامل دو فاکتور NAA و فراصوت، آزمایش سوم شامل دو فاکتور BA و فراصوت، آزمایش چهارم شامل دو فاکتور بهترین ترکیب‌های هورمونی جهت ریزادیادی همراه با فراصوت بود. برای فراصوت‌دهی به ریزنمونه‌ها، لوله‌ها داخل دستگاه حمام فراصوت (مدل BANDELIN) با فرکانس ۳۵ کیلوهرتز و در زمان‌های صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ثانیه قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت MS دارای تنظیم‌کننده‌ی رشد BA یا NAA هر کدام در ۴ غلظت صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی گرم در لیتر کشت گردید. سپس کشت‌های انجام شده در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از گذشت ۳ ماه، صفات مورفولوژیکی مربوط به پیازچه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 صورت گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

در آزمایش اول، غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BA (هر کدام در ۴ سطح صفر، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱

میلی‌گرم در لیتر)، جهت تعیین بهترین ترکیب هورمونی برای باززایی سوسن چلچراغ از ریزنمونه‌ی فلس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر ترکیب‌های تیماری مختلف بر صفات وزن پیازچه‌ها، میانگین وزن هر پیازچه، تعداد پیازچه‌ها و تعداد فلس‌ها در سطح احتمال ۱ درصد و بر وزن تر کل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید. همچنین اثر متقابل NAA و BA بر میانگین تعداد فلس در هر پیازچه معنی‌دار نشد. بر اساس مقایسه میانگین ترکیبات هورمونی با استفاده از روش چند دامنه‌ای دانکن، بیشترین وزن تر کل در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد که با ترکیب‌های هورمونی دیگر از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند. اکسین‌ها ممکن است با دخالت در بیوسنتز و یا فعالیت آنزیم، سبب هیدرولیز پلی‌ساکاریدها و تولید ساکاریدهای ساده‌تر و مونوساکاریدهای فعال از نظر اسمزی مانند گلوکز و یا فروکتوز شوند که باعث افزایش جذب آب و رشد طولی سلول‌ها و در نتیجه افزایش وزن تر می‌شوند. چنین اثری در بافت‌های ذخیره‌ای دیده شده است (Fahimi, 1998). در آزمایش‌های انجام گرفته روی هیبریدهای سوسن شرقی گزارش شد که بیشترین وزن تر از فلس‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون تنظیم‌کننده‌ی BA به‌دست آمد (Kumar *et al.*, 2007).

در پژوهشی که روی سوسن چلچراغ انجام شد، بیشترین وزن کل از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (Meamare-Moshrefi *et al.*, 2005). این گزارش‌ها با نتایج این آزمایش مبنی بر تأثیر غلظت‌های بالای اکسین بر وزن تر همخوانی دارد. در تحقیق دیگری، فلس‌های پیاز و قسمت‌هایی از برگ به‌عنوان ریزنمونه‌ی هیبرید آسیایی سوسن روی محیط کشت پایه‌ی MS حاوی تنظیم‌کننده‌های BA و NAA کشت شده بود. در هر دو ریزنمونه، با افزایش ۱ میلی‌گرم در لیتر BA وزن تر افزایش یافت و در غلظت بیش از آن وزن تر کاهش پیدا کرد (El-Naggar *et al.*, 2012). تفاوت نوع هورمون تأثیرگذار در آزمایش یاد شده، با نتایج این پژوهش ممکن است ناشی از تفاوت در میزان هورمون‌های درون‌زاد مختلف در گونه‌های مختلف سوسن باشد. همچنین بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها ترکیب‌های تیماری ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAنیز دارای بیشترین میانگین وزن هر پیازچه بودند که از این لحاظ اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند (جدول ۱). هورمون NAA تأثیر معنی‌داری در افزایش وزن پیازچه نداشت، اما غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در افزایش وزن پیازچه تأثیر زیادی داشت. از این رو می توان گفت که در کنار ژنوتیپ، هورمون‌های درون‌زاد نیز ممکن است یکی از مهمترین عوامل تعیین‌کننده‌ی تولید پیازچه از ریزنمونه‌ها باشد (Azadi and Khosh-Khui, 2007).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که بدون تنظیم‌کننده‌های رشد نیز تولید پیازچه صورت می‌گیرد. به نظر می‌رسد که نسبت اکسین به سایتوکاینین درون‌زاد در فلس‌های سوسن برای تحریک القای پیازچه در هر دو شرایط نوری و تاریکی کافی است (Pelkonen and Kauppi, 1999). بیشترین تعداد پیازچه در این آزمایش به‌ترتیب در محیط کشت‌های حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAAبه‌علاوه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل گشت که از لحاظ آماری با تیمارهای صفر میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر میلی‌گرم در لیتر BA اختلاف معنی‌داری نداشتند. بیشترین تعداد فلس تولید شده نیز در ترکیب تیماری ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. همچنین محیط‌های کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۱ میلی‌گرم

در لیتر NAA با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر میلی‌گرم در لیتر BA نیز تعداد فلس بیشتری نسبت به شاهد داشتند. کمترین تعداد کل پیازچه وفلس‌های باززایی شده از غلظت بالای تنظیم‌کننده‌های رشد مشاهده شد، به‌طوری‌که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کمترین مقادیر این صفات را داشت، در حالی‌که وزن هر پیازچه در این غلظت‌ها بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. در تمام سطوح مختلف هورمون NAA، بیشترین تعداد پیازچه و تعداد کل فلس‌ها در غلظت پایین BA مشاهده شد و با افزایش غلظت BA تولید پیازچه و در نتیجه تعداد فلس‌ها کاهش یافت، در حالی‌که وزن آن‌ها افزایش یافت. با توجه به این‌که سایتوکاینین‌ها به‌طور معمول در باززایی نقش دارند، به نظر می‌رسد ریزنمونه‌های سوسن چلچراغ حاوی مقادیر کافی از هورمون‌های سایتوکاینینی هستند و به سایتوکاینین خارجی نیاز ندارند (Meamare-Moshrefi *et al.*, 2003).

با توجه به رقابت شدیدتر پیازچه‌ها در محیط کشت بافت، این رقابت سبب می‌گردد تا تیماری که دارای پیازچه بیشتری است، با وجود داشتن اکسین بیشتر وزن پیازچه‌ی بیشتری را تولید نکند. این نتایج با گزارشی مبنی بر این‌که حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت سوسن چلچراغ، با وجود افزایش تعداد پیازچه منجر به کاهش در وزن تر پیازچه‌ها در مقایسه با شاهد شد (Bakhshaie *et al.*, 2010) مطابقت داشت.

جدول ۱- مقایسه میانگین تأثیر ترکیب تیماری NAA و BA بر پیازچه‌زایی

Table 1. Interaction effect of NAA, BA on the bulblet production

تعداد فلس Number of scales	تعداد پیازچه Number of bulblet	میانگین وزن هر پیازچه (گرم) Mean of Bulblet fresh weight (gr)	وزن پیازچه (گرم) Bulblet fresh weight (gr)	وزن تر کل (گرم) Total fresh weight (gr)	بنزیل آدنین (میلی‌گرم در لیتر) BA (mg l^{-1})	نفتالین استیک اسید (میلی‌گرم در لیتر) NAA (mg l^{-1})
24^{cde}	6.25^{bc}	0.074^{cd}	0.499^{bcd}	0.846^{bc}	0	0
31^{bcd}	10.25^{ab}	0.035^{d}	0.513^{bcd}	0.804^{c}	0.01	
14.5^{def}	3.5^{cde}	0.128^{bc}	0.383^{cd}	1.738^{abc}	0.1	
24.5^{cde}	5.5^{bc}	0.118^{bcd}	0.637^{bcd}	1.366^{abc}	0	0.01
53.75^{a}	15^{a}	0.056^{d}	0.849^{ab}	1.583^{abc}	0.01	
17^{de}	4.5^{cde}	0.061^{cd}	0.4^{cd}	0.675^{c}	0.1	
22^{cde}	4.5^{cde}	0.113^{bcd}	0.493^{bcd}	1.97^{abc}	1	
22.25^{cde}	7.75^{bc}	0.05^{d}	0.83^{cd}	1.343^{abc}	0	0.1
47.5^{ab}	15.5^{a}	0.062^{cd}	0.84^{ab}	2.141^{abc}	0.01	
46.67^{ab}	14^{a}	0.05^{d}	0.711^{abc}	2.48^{ab}	0.1	
13.67^{ef}	2^{de}	0.182^{ab}	0.478^{bcd}	0.927^{bc}	1	
38.5^{abc}	10^{ab}	0.113^{bcd}	1.053^{a}	2.875^{a}	0	1
22.5^{cde}	7.25^{bc}	0.055^{d}	0.418^{cd}	2.846^{a}	0.01	
16^{de}	5^{cd}	0.092^{cd}	0.292^{d}	0.683^{c}	0.1	
3.75^{f}	1.5^{d}	0.2^{a}	0.33^{d}	1.394^{abc}	1	

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (در سطح ۵ درصد).

Means in each column with the same letters are not significantly different at 5% level.

Meamar-Moshrefi *et al.* (2003) نشان دادند که در گیاه سوسن چلچراغ، بیشترین وزن کل پیازچه و تعداد پیازچه از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. همچنین حداکثر وزن پیازچه از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. Azadi and Mojtahedi (2007) گزارش کردند که در سوسن چلچراغ بیشترین وزن پیازچه در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۶۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد. در پژوهش دیگری که روی فلس‌های برداشته شده از سوخ در حال رشد *L. rubellum* Baker انجام شد، غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA اثر تحریکی بر روی وزن تر پیازچه داشت، اما غلظت‌های بالاتر آن، از تشکیل پیازچه جلوگیری کرد (Niimi, 1985). نتایج این پژوهش‌ها با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت. در پژوهش دیگری، وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت فلس سوسن چلچراغ وزن تر پیازچه‌ها را در مقایسه با شاهد افزایش داد و بیشترین مقدار آن در ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد (Azadi and Khosh-Khui, 2007). نتایج این تحقیق با نتایج گزارش حاضر مطابقت داشت. Tatari-Varnousefaderani *et al.* (2007) بیان کردند، دورگ آسیایی بیشترین وزن پیازچه را در محیط دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA تولید کرد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. در آزمایشی که روی *L. longiflorum* انجام شد، سنگین‌ترین پیازچه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (Mir *et al.*, 2012). در سوسن شرقی گزارش شد که پیازچه‌های سنگین در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد (Kumar *et al.*, 2008). همچنین در تحقیق دیگری که با استفاده از ریزنمونه‌های ریشه و گره سوسن‌های هیبرید انجام شده بود، حداکثر میانگین وزن تر هر پیازچه روی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شده است (Kapoor *et al.*, 2009؛ Kapoor *et al.*, 2008). در آزمایش‌های انجام گرفته روی هیبریدهای سوسن شرقی گزارش شد که بیشترین وزن هر پیازچه از فلس‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون تنظیم‌کننده‌ی BA به‌دست آمد (Kumar *et al.*, 2007). در سوسن چلچراغ نشان داده شده است که بیشترین وزن پیازچه از محیط کشت دارای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BA حاصل شد (Tatari-Varnousefaderani *et al.*, 2007). این نتایج با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نداشت. تفاوت نتایج گزارش‌های یاد شده با تحقیق حاضر ممکن است به دلیل تفاوت در نوع گونه و یا محل جمع‌آوری گیاه باشد، زیرا ژنوتیپ می‌تواند از عوامل تأثیرگذار بر میزان هورمون‌های درون‌زا باشد.

در آزمایش دوم غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌ی رشد NAA و زمان‌های مختلف قرارگیری در معرض امواج فراصوت جهت باززایی فلس سوسن چلچراغ مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش به دلیل اثرات امواج فراصوت، پس از مدتی تعدادی از ریزنمونه‌های فلس از بین رفت که این تیمارها در تجزیه‌ی داده‌ها حذف شدند. براساس گزارش‌های به‌دست آمده، وقتی بافت‌های مختلف گیاهی که حاوی کانال‌های پر گاز درون‌سلولی هستند در معرض ارتعاشات امواج فراصوت قرار می‌گیرند، ارتعاش کانال‌ها نابسامانی‌هایی را در مقیاس میکروسکوپی ایجاد می‌کند که می‌تواند ساختار یا عملکرد عادی سلول را مختل کند (Miller, 1983). گزارش شده است که فراصوت، فراساختار سلول‌ها از قبیل غشای سلولی، اسکلت سلولی، کلروپلاست‌ها و میتوکندری را می‌تواند تخریب کند (Liu *et al.*, 2003).

اثر برگشت‌ناپذیر فراصوت به نظر می‌رسد که منجر به مرگ سلول شود، که در این مطالعه در مورد ریزنمونه‌های فلسی دیده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در این آزمایش نشان داد که اثر متقابل ترکیب‌های NAA و فراصوت در صفات وزن پیازچه‌ها، میانگین وزن هر پیازچه

و تعداد فلس در هر پیازچه در سطح احتمال ۱ درصد و در صفات وزن تر کل، تعداد پیازچه‌ها و تعداد فلس‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید. مقایسه میانگین داده‌ها برای اثر متقابل تیمارهای NAA و امواج فراصوت نشان داد که بیشترین وزن تر کل از تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر ثانیه فراصوت‌دهی حاصل شد که با تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت‌دهی و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر ثانیه فراصوت‌دهی اختلاف معنی‌داری نداشت. بیشترین وزن کل پیازچه‌ها مربوط به تیمارهای صفر میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت دهی، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر ثانیه، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ ثانیه، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ ثانیه، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۱۰ ثانیه، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر ثانیه، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ و ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی بود که از میان آن‌ها تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر ثانیه فراصوت‌دهی بیشترین مقدار را داشت. ترکیب‌های تیماری ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر ثانیه فراصوت‌دهی و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر ثانیه فراصوت‌دهی سنگین‌ترین پیازچه‌های تولید شده را به خود اختصاص دادند و با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ترکیب‌های تیماری صفر میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ ثانیه، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ ثانیه، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ و ۱۰ ثانیه، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر، ۵، ۲۰ و ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی بیشترین تعداد پیازچه را نسبت به شاهد داشتند و بیشترین تعداد فلس‌های حاصل شده نیز از ترکیب‌های تیماری صفر میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ ثانیه، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر، ۵ ثانیه، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر، ۵، ۱۰ ثانیه، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر، ۵، ۲۰ و ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی حاصل گشت که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری از این لحاظ نداشتند. از میان ترکیب‌های تیماری یاد شده بیشترین تعداد پیازچه‌ها و فلس‌های تولید شده مربوط به تیمارهای صفر میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ ثانیه و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۵ ثانیه فراصوت‌دهی بود. با توجه به نتایج حاصل، مدت کم فراصوت باعث افزایش تعداد پیازچه‌ها شده است. ولی اندازه‌ی پیازچه‌ها را افزایش نداده است و بیشترین میانگین وزن هر پیازچه و تعداد فلس در هر پیازچه از ریزنمونه‌های فراصوت داده نشده حاصل گردیده است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین تعداد فلس در هر پیاز از تیمارهای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAAبا صفر ثانیه فراصوت‌دهی و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه صفر ثانیه فراصوت‌دهی حاصل گردید که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲).

در آزمایش سوم غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌ی رشد BA و زمان‌های مختلف قرارگیری در معرض امواج فراصوت جهت باززایی پیازچه‌ی سوسن چلچراغ از ریزنمونه‌ی فلس مورد بررسی قرار گرفت. در کناره‌های برخی از فلس‌های آسیب‌دیده توده‌های کالوس مانندی تولید شده بود که شبیه به فلس‌های بسیار ریز در حد میلی‌متر بودند که رشد نیافته بودند. همچنین فلس‌های فراصوت داده شده که در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کشت شده بودند، پیازچه‌هایی تولید کردند که به ندرت فلس‌های آن‌ها تمایز یافته بودند. گزارش شده است که به دنبال تیمار فراصوت، نسبت کل سایتوکاینین‌ها به IAA افزایش می‌یابد که این حالت به علت کاهش سطح IAA درون‌زا و افزایش سطح کل سایتوکاینین‌های درون‌زا می‌باشد (Wei *et al.*, 2012).

در آزمایشی که در آن فلس‌های پیاز *Lilium oriental hybrid* 'Casablanca' روی محیط کشت MS حاوی سایتوکاینین‌ها (کینتین، BA، تیدیازورون کشت شده بود، قسمت پایگاهی فلس‌های پیاز متورم شده و تشکیل شاخه‌های نابجا را با شاخساره‌ی کوچک، فلس‌های پیاز برگی و صفحه‌های پایگاهی برآمدگی غیر عادی داد (Han *et al.*, 2005). بنابراین عدم تمایزیابی کامل فلس‌ها در این آزمایش ممکن است غلظت بیش از حد سایتوکاینین نسبت به NAA در ریزنمونه‌های فلس باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر متقابل تیمار NAA و امواج فراصوت در ریزنمونه‌ی فلس

Table 2. Interaction effect of NAA and ultrasound on the scales explant

نفتالین استیک‌اسید (میلی‌گرم در لیتر) NAA (mg l^{-1})	مدت فراصوت (ثانیه) Time of ultrasound (s)	وزن تر کل (گرم) Total fresh weight (gr)	وزن پیازچه (گرم) Bulblet fresh weight (gr)	وزن هر پیازچه (گرم) Per Bulblet fresh weight (gr)	تعداد پیازچه Number of bulblet	فلس تعداد Number of scales	میانگین تعداد فلس هر پیازچه Mean of scalesin each bulblet
0	0	0.864^{bc}	0.499^{bcd}	0.075^{b}	6.25^{cd}	24^{abc}	3.77^{ab}
	5	0.897^{bc}	0.804^{ab}	0.037^{c}	20^{a}	46.33^{ab}	2.27^{cd}
0.01	0	1.366^{abc}	0.637^{abcd}	0.115^{a}	5.5^{cd}	24.5^{abc}	4.47^{a}
	5	1.591^{abc}	0.937^{ab}	0.049^{bc}	19^{ab}	52.75^{a}	2.95^{bc}
0.1	0	1.343^{bc}	0.38^{bcd}	0.051^{bc}	7.75^{bcd}	22.25^{abc}	2.65^{cd}
	5	1.027^{bc}	0.728^{abc}	0.045^{c}	16.25^{abc}	43.75^{ab}	2.75^{cd}
	10	0.966^{bc}	0.74^{abcd}	0.05^{bc}	13.7^{abcd}	33^{abc}	2.25^{cd}
	20	0.454^{c}	0.227^{cd}	0.029^{c}	7.5^{bcd}	17^{c}	1.8^{d}
	30	0.443^{c}	0.159^{d}	0.031^{c}	4.5^{d}	12.25^{c}	2.52^{cd}
1	0	2.716^{a}	1.21^{a}	0.138^{a}	8^{abcd}	34.25^{abc}	4.3^{a}
	5	1.174^{bc}	0.678^{abcd}	0.046^{c}	16.5^{abc}	34.5^{abc}	2.22^{cd}
	10	0.683^{bc}	0.364^{bcd}	0.049^{bc}	8^{bcd}	17.25^{bc}	2.42^{cd}
	20	0.681^{bc}	0.491^{bcd}	0.036^{c}	14.75^{abcd}	28.5^{abc}	1.87^{d}
	30	1.748^{ab}	0.788^{ab}	0.048^{bc}	16.1^{abc}	45^{ab}	2.77^{cd}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (در سطح ۵ درصد).

Means in each column with the same letters are not significantly different at 5% level.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر ترکیبات تیماری بر صفات تعداد پیازچه‌ها و تعداد فلس‌ها در سطح احتمال ۱ درصد و بر میانگین وزن هر پیازچه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار گردید. بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل ترکیبات مختلف BA و فراصوت بر وزن تر کل، وزن پیازچه‌ها، میانگین تعداد فلس در هر پیازچه معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین داده‌ها اثر متقابل تیمارهای BA و امواج فراصوت نشان داد که بیشترین وزن پیازچه‌های باززایی شده از تیمار شاهد و ترکیب‌های تیماری ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۵ ثانیه، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA با صفر، ۵ و ۳۰ ثانیه، ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ثانیه فراصوت حاصل شد که از میان آن‌ها تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه صفر ثانیه فراصوت سنگین‌ترین پیازچه‌ها را داشت. رقابت بین پیازچه‌ها بر سر به دست آوردن مواد غذایی در محیط کشت بافت سبب می‌گردد تا تیماری که دارای پیازچه کمتری است، وزن پیازچه‌ی بیشتری را داشته باشد. همچنین بیشترین تعداد فلس‌ها از ترکیب تیماری صفر میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت حاصل گشت که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با تیمارهای شاهد و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA با صفر ثانیه، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۵ ثانیه، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۵ و ۳۰ ثانیه، ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه صفر ثانیه نداشت (جدول ۳).

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد در اندام‌زایی سوسن‌های مختلف متفاوت بوده و بعضی از محققین گزارش کرده‌اند که سایتوکاینین‌ها تأثیری در قابلیت تولید سوسن‌ها از ریزنمونه‌های اولیه ندارند و حتی از تمایز جلوگیری می‌کنند. برخی محققین تأثیر تحریکی کمی را در اثر کاربرد سایتوکاینین‌ها در تولید پیازچه‌های سوسن یافته‌اند و برخی به‌طور موفقیت‌آمیزی کاربرد غلظت بالای BA در ترکیب با اکسین‌ها در تولید ارقام مختلف سوسن‌ها گزارش کرده‌اند (Padashe-Dehkaii *et al.*, 2006).

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر متقابل تیمار BA و امواج فراصوت در ریزنمونه‌ی فلس

Table 3. Interaction effect of BA and ultrasound on the scales explant

بنزیل آدنین (میلی‌گرم در لیتر) BA (mg/L)	مدت فراصوت (ثانیه) Time of ultrasound (s)	میانگین وزن هر پیازچه (گرم) Bulblet weight (g)	تعداد پیازچه Number of bulblet	تعداد فلس Number of scales
0	0	0.075^{abc}	6.25^{bcd}	24^{abc}
	5	0.037^{c}	20^{a}	46^{a}
0.01	0	0.053^{bc}	10.25^{bc}	31^{abc}
	5	0.069^{abc}	9.75^{bc}	31^{abc}
0.1	0	0.128^{a}	3.5^{d}	15.5^{bcd}
	5	0.117^{a}	12^{b}	41.33^{ab}
	30	0.091^{abc}	5.5^{bcd}	22^{abc}
1	0	0.09^{ab}	4.33^{cd}	19.33^{abc}
	10	0.065^{abc}	4.75^{cd}	3^{d}
	20	0.116^{a}	3^{d}	13^{cd}
	30	0.078^{abc}	4.67^{cd}	13.33^{cd}

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (در سطح ۵ درصد).

Means in each column with the same letters are not significantly.

فراصوت به‌عنوان تسریع‌کننده‌ی عبور مولکول‌ها از میان غشاها شناخته می‌شود. تحریک فراصوت ممکن است روی فعالیت Ca^{2}-ATPase و H^{+}-ATPase در غشای پلاسمایی و کانال‌های یونی دیگر که برای رشد و تکثیر سلول خیلی مهم است تأثیر بگذارد (Liu *et al.*, 2003). گزارش شده است فرکانس و مقدار انرژی مورد نیاز برای تأثیر تیمار فراصوت به نظر می‌رسد که به‌طور گسترده بین گونه‌ها و ارقام متفاوت باشد (Ananthakrishnan *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان بیان نمود که محیط کشت MS حاوی تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت دارای بیشترین تعداد پیازچه‌های باززایی شده بود. با این حال ترکیب تیماری ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۵ ثانیه فراصوت نیز ضمن داشتن تعداد پیازچه‌ی زیاد، پیازچه‌های درشت‌تری نیز داشت. بنابراین به نظر می‌رسد تیمار فراصوت در ترکیب با هورمون در محیط کشت بافت در تحریک پیازچه‌زایی در ریزنمونه فلس مؤثر است. همچنین تیمار فراصوت می تواند به‌عنوان یک تنش غیرزیستی باعث تحریک سلولی در شرایط درون شیشه‌ایی به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه گردد.

References

Ananthakrishnan, G., Xia, X., Amutha, S., Singer, S., Muruganantham, M., Yablonsky, S., Fischer, E. and and Gaba, V. (2007). Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants *in vitro*. Plant Cell Reports, 26(3), 267-276.

Arzate-Fernandez, A. M., Miwa, M., Shimada, T., Yonekura, T. and Ogawa, K. (2007). *In vitro* propagation of Miyamasukashi-Yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. Bukosanense), an endangered plant species. Revista Fitotecnia Mexicana, 30(4), 373-379.

Azadi, P. and Khosh-Khui, M. (2007). Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulators, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. Electronic Journal of Biotechnology, 10(4), 582-591.

Azadi, P. and Mojtahedi, N. (2007). Effect of growth regulators, sucrose concentration and scale segment on micropropagation of *Lilium ledebourii* in winter harvested bulbs. Pajouhesh- va- Sazandegi in Agronomy & Horticulture Journal, 81, 154-159. [In Farsi]

Bakhshaie, M., Babalar, M., Mirmasoumi, M. and Khalighi, M. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss and endangered species. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 102(2), 229-235.

Ekrami, T. (1980). Flower and ornamental. Tehran: University of Tehran Press. [In Farsi]

El-Naggar, H., Osman, A. and Sewedan, E. (2012). *In vitro* propagation and organogenesis of *Lilium* 'Prato'. African Journal of Biotechnology, 11(82), 14771-14776.

Fahimi, H. (1998). Plant regulators. Tehran: University of Tehran Press. [In Farsi]

Farsam, H., Amanlou, M., Amin, G., Nezamivand-Chegini, G., Salehi- Surmaghi, M. H. and Shafiee, A. (2003). Anatomical and phytochemical study of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss; a rare endemic species in Iran. DARU Journal, 11(4), 164-170.

Gasemi Gahsareh, M. and Kafi, M. (2006). Scientific and practical floriculture (1st ed.). Isfahan: Golbon Press. [In Farsi]

Han, B. H., Yae, B. W., Yu, H. J. and Peak, K. Y. (2005). Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium oriental* hybrid 'Casablanca' by the formation of shoot

with abnormally swollen basal plates. Scientia Horticulturae, 103(3), 351-359.

Jin, L., Zhang, Y., Yan, L., Guo, Y. and Niu, L. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of bulb extracts of six Lilium species native to China. Molecules, 17(8), 9361-9378.

Kapoor, R., Kumar, S. and Kanwar, J. K. (2008). Bulblet regeneration from *ex-vitro* root explant in lily hybrids. Horticultural Science, 35(3), 107-112.

Kapoor, R., Kumar, S. and Kanwar, J. K. (2009). Bulblet production from node explant grown *in vitro* in hybrid lilies. International Journal of Plant Production, 3(4), 1-6.

Kumar, S., Awasthi, V. and Kanwar, J. K. (2007). Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *in vitro* bulblet formation and growth in oriental lily. Horticultural Science (Prague), 34(2), 77-83.

Kumar, S., Chaudhary, V. and Kanwar, J. K. (2008). Bulblet regeneration from *in vitro* roots of oriental lily hybrid. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 16, 353-360.

Liu, Y., Takatsuki, H., Yoshikoshi, A., Wang, B. and Sakanishi, A. (2003). Effects of ultrasound on the growth and vascuolar H^+-ATPase activity of *Aloe arborescens* callus cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 32(2), 105-116.

Meamar-Moshrefi, M., Moieni, A. and Tavassolian, I. (2003). Effects of plant growth regulators NAA, BAP, different explants scale and photoperiod on tissue culture of *Lilium ledebourii* Boiss. Iranian Journal of Crop Sciences, 4(4), 253-261. [In Farsi]

Meamar-Moshrefi, M., Moieni, A and Tavassolian, I. (2005). Effects of Plant Growth Regulators and Scale on Propagation of *Lilium ledebourii* (Boiss). Iranian Journal of Agriculture Science, 35(4), 1033-1041. [In Farsi]

Miller, D. L. (1983). The botanical effects of ultrasound: A review. Environmental and Experimental Botany, 23(1), 1-27.

Mir, J. I., Ahmed, N., Itoo, H., Sheikh, M. A., Rashid, R. and Wani, S. H. (2012). *In vitro* propagation of Lilium (*Lilium longiflorum*). Indian Journal of Agricultural Sciences, 82(5), 455-558.

Niimi, Y. (1985). Factors affecting the regeneration and growth of bulblets in bulb scale cultures of *Lilium rubellum* Baker. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 54(1), 82-86.

Padasht Dahkaei, M. N., Khalighi, A., Naderi, R. and Mousavi, A. (2006). Effect of temperature, propagation media and scale position on bulblet regeneration of Chelcheragh lily (*Lilium ledebourii*) by scaling method. Seed and Plant, 22(3), 383-397. [In Farsi]

Pelkonen, V.P. and Kauppi, A. (1999). The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. International Journal of Plant Sciences, 160(3), 483-490.

Tatari-Varnousefaderani, M., Fotouhi Ghazvini, R. and Hamidoghli Y. (2007). The effect of lily species, plant growth regulators and origin of explants on micropropagation of Chelcheragh (*Lilium ledebourii*) and Asiatic hybrid lilies. Iranian Journal of Agriculture Science, 38(1), 276-284. [In Farsi]

Wei, M., Yang, C. Y. and Wei, S. H. (2012). Enhancement of the differentiation of protocorm like bodies of *Dendrobium officinale* to shoots by ultrasound treatment. Journal of Plant Physiology, 169(8), 770-774.

The Influence of Ultrasound and Growth Regulators on *in vitro* Micropropagation of *Lilium Ledebourii* Boiss

Z. Azimzadeh[1], M. Mohebodini[2]*, E. CHamani[3] and M. Erfani[4]

1- Graduate M.Sc. of Horticulture Science, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (mohebodini@uma.ac.ir)
3- Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4- Ph.D. Student of Horticulture Science, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 28 May, 2016 Accepted: 17 May, 2017

Abstract

Background and Objectives

Lilium ledebourii is one of the wild species of Lilium genus, growing in northern Iran. This species has high potential for export. Plant tissue culture techniques are widely used in plant propagation, and using these methods can effectively provide micro-propagation of this plant in the large scale. High percentage of regeneration is necessary for plant protection, used in the breeding programs.

Materials and Methods

The experiment was factorial based on completely randomized design with four replications and was carried out in tissue culture Lab of Mohaghegh Ardabili University in 2015. For this purpose, segments of explant that were treated with ultrasound were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of NAA and BA alone and/or in combination with each other. This experiment conducted Concentrations of NAA at four level Zero, 0.01, 0.1 and 1 mgl^{-1} and Concentrations of BAP at four levels Zero, 0.01, 0.1 and 1 mgl^{-1} and Ultrasound at four levels zero, 5, 10, 20 and 30 seconds. In order to remove possible contamination from the mediums, all media were autoclaved for 30 minutes at 121 °C. At the end of the experiment, the number of bulblet produced, root length, fresh weight of bulblet and etc were recorded. The cultures were kept at 20°C or 25°C under 16 h photoperiod or in darkness.

Results

The results showed the highest number of bulblets produced in 0, 0.01, 0.1 mg L^{-1} NAA and 5secend ultrasound, 0.1 mg L^{-1} NAA and 0, 5, 20 and 30 second ultrasound compared with control. The highest frequency of bulblet regeneration was produced in MS medium supplemented with 0, 0.01, 0.1 mg L^{-1} NAA and 5 second ultrasound. On the other hand, 0.1 mg L^{-1} NAA and 5 second ultrasound increased number and weight of bulblets. Different concentrations of NAA had also significant effects**.**

Discussion

On the other hand, ultrasound increased the number and weight of bulblets. Mechanical stress and micro streaming by acoustic cavitation might be considered as the most possible cause of the various physiological effects of ultrasound on cells. Low-energy ultrasound can modify cellular metabolisms or facilitate the uptake of nutrient, and make them easily through the cellular walls and membranes. Finally, it seems that ultrasound in combination with growth regulators have the potential to produce the highest average number of bulblets in the scale explant, using plant growth regulators in combination with an abiotic stress in *in vitro*.

Keywords: Bulblet, Explant, Hormonal combination, In vitro, Scale