دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هجدهم، شماره اول، ۱۳۹۰
www.gau.ac.ir/journals

بررسی اندام‌زایی و کالوس‌زایی فلس گل سوسن (*Lilium longiflorum*) در شرایط درون شیشه‌ای

***نورالدین ایزدی[۱]، کامبیز مشایخی[۲]، اسماعیل چمنی[۳] و بهنام کامکار[۴]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، [۴]استادیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲٤

چکیده

به‌منظور بررسی اثرات درون شیشه‌ای و باززایی فلس گل سوسن (*Lilium longiflorum*) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و ایندول استیک اسید (IAA) در محیط کشت پایه B_5، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام گردید. تیمارهای اعمال شده در این پژوهش شامل تنظیم‌کننده‌های IAA و 2,4-D هر یک شامل ٤ سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و ترکیب متقابل هر یک از این سطوح در این محیط کشت بود. بررسی نتایج به‌دست آمده نشان داد که با افزایش غلظت IAA تا ۲ میلی‌گرم در لیتر تعداد پیازچه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کردند ولی هیچ تفاوت معنی‌داری بین استفاده از غلظت‌های مختلف IAA و پارامترهای ریشه‌زایی و کالوس‌زایی در محیط کشت مشاهده نشد. با افزایش غلظت 2,4-D تا ۲ میلی‌گرم در لیتر از تعداد پیازچه، طول و تعداد ریشه کاسته شد. کالوس‌زایی در حضور 2,4-D انجام شد و با افزایش آن بر وزن تر کالوس افزوده شد. طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش به‌طور میانگین از یک پیاز بالغ گل سوسن امکان حصول حدود ۱۵۰-۱۰۰ گیاهچه وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: گل سوسن، فلس، اندام‌زایی، کالوس، محیط کشت

* مسئول مکاتبه: izadi03@yahoo.com

مقدمه

بی‌شک نیاز و علاقه به گیاهان از دیرباز در انسان‌ها شکل گرفته است. انسان‌ها شاید ابتدا تنها به عنوان غذا و پوشش، ولی بعدها به‌عنوان زیبایی و طراوت بخشیدن به زندگی، سخت به آن‌ها نیازمند شده‌اند. پس برای رسیدن به آرامش دلخواه، زندگی در آغوش طبیعت و زیبایی‌هایش و در آمیختن با فرایند آن دلپذیر و شادی‌آفرین خواهد بود. بنابراین گیاهان زینتی جزو ابزار جدانشدنی زندگی انسان‌ها گردید و لازم است بر ماست هرچه بیش‌تر و بهتر در شناخت، حفظ و تکثیر آن‌ها کوشیده شود. یکی از روش‌های نوین مورد استفاده برای این منظور، روش‌های ریزازدیادی می‌باشد که این اصطلاح به‌طور اختصاصی به کاربرد فنون کشت بافت برای گیاه‌افزایی با استفاده از ریزنمونه‌هایی که در شرایط عاری از هر گونه از آلودگی و در ظروف کشت پرورش می‌یابد مربوط می‌شود (هارتمن و همکاران، ۱۹۹۷). بنابراین کشت بافت تکنیکی است که امکان تولید گیاه در شرایط درون شیشه‌ای را فراهم می‌کند. اساس این تکنیک توانمند بودن سلول‌های گیاهی است زیرا هر سلول گیاهی دارای همه اطلاعات ژنتیکی لازم برای تبدیل شدن به یک گیاه کامل است. بنابراین کشت سلول، بافت یا اندام این امکان را فراهم می‌کند که با کشت قطعات یکی از اندام گیاه سایر قسمت‌های آن نیز تشکیل می‌گردد. این تکنیک به‌طور رایج برای اهداف بسیار متفاوتی مانند القای کالوس، اندام‌زایی، جنین‌زایی رویشی و غیره استفاده می‌شود (حسندخت و ابراهیمی، ۲۰۰۶).

گسترده‌ترین کاربرد عملی فنون کشت بافت در باززایی و تکثیر رویشی گیاهان زینتی می‌باشد. در کاربرد فنون کشت بافت برای گیاهان زینتی، سه هدف اولیه شامل حذف بیماری و در نتیجه تولید گیاهان عاری از آن، تولید گیاهان هم‌گروه در سطح زیاد و تولید رقم‌های جدید می‌باشد که بیش‌تر پژوهش‌ها بر روی دو هدف اول متمرکز شده است. علاوه‌بر اهداف بالا، فنون کشت بافت چندین برتری برای تولید تجاری دارد که یکی از آن‌ها نیاز نداشتن به گیاه مادری در مراحل بعدی ریزازدیادی می‌باشد، زیرا ریزنمونه‌های لازم برای افزایش بعدی از گیاهک‌هایی که درون شیشه کشت شده است به‌دست می‌آید. گیاهان زینتی پیازی نیز از این قاعده مستثنی نبوده و ریزازدیادی در آن‌ها به‌عنوان یک روش متداول تکثیر توجه بسیاری را جلب کرده است و این یک امتیاز برای این گونه گیاهان محسوب می شود (نواک و پترو، ۱۹۸۱).

گل سوسن با نام علمی *Lilium longiflorum* متعلق به خانواده لیلیاسه[1] می‌باشد. این گل از نظر گیاه‌شناسی جزء گیاهان پیازدار، تک‌لپه‌ای و دایمی می‌باشد. این گونه باارزش‌ترین گونه جنس

1- Liliaceae

سوسنی‌ها محسوب می‌شود (اکرامی، ۱۹۸۰). نخستین گزارش‌ها در مورد ریزازدیادی گل سوسن در دهه ۱۹۵۰ ارایه گردید. استفاده از روش‌های کشت بافت برای ازدیاد گیاهان پیازی به‌دلیل توانایی بالای این روش‌ها برای تولید انبوه در سطح تجاری دارای اهمیت بوده و به‌عنوان یک روش کارآمد مطرح می‌باشند و به‌رغم وجود برخی مشکلات در ریزازدیادی گیاهان پیازی پیشرفت‌های فراوانی در این زمینه به‌دست آمده است که در زیر به بخشی از آن‌ها اشاره شده است.

استیمارت و آشر (۱۹۷۸) بخش‌هایی از فلس‌های سوسن *Lilium longiflorum* را بر روی محیط کشت LS کشت کردند و نشان دادند که افزودن ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA منتج به تولید بیش‌تر پیازچه از فلس‌های خارجی شد. نوواک و پترو (۱۹۸۱) تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP را بر روی باززایی پیازچه از ریزنمونه‌های فلسی نوعی سوسن هیبرید[1] بررسی کردند و نشان دادند که ترکیبی از ۵ میکرومولار BAP و ۱ میکرومولار NAA در محیط کشت LS بیش‌ترین سوخک‌ها را برای هر ریزنمونه تولید کرد. در همین راستا تأثیر مثبت اکسین‌ها بر افزایش پیازچه‌زایی گل سنبل و گل لاله نیز به‌ترتیب توسط پیریک و استیگمنز (۱۹۷۵) و پادوزینسکا (۲۰۰٦)گزارش شده است. نات (۱۹۹۸) طی آزمایشی نشان داد که هورمون NAA ریشه‌زایی در *L. longiflorum* را بهبود می‌بخشد و در آزمایشی مشابه تأثیر مثبت اکسین‌ها بر افزایش تشکیل ریشه در *L. nepalens* نیز گزارش گردید (واروش و همکاران، ۲۰۰۱). طی آزمایشی کیم و کیم (۲۰۰۵) مشخص کردند که مقدار اکسین طبیعی در فلس گل سوسن در طول دوره بلوغ پیازها بیش‌تر سنتز می‌شود. مشایخی و اکبرپور (۲۰۰۸) بیان کردند اکسین طبیعی (IAA) هورمونی ناپایدار بوده و در برابر نور توسط فتواکسیداسیون از سیستم کشت حذف می‌شود. گرونوالد و همکاران (۱۹۷۷) گزارش کردند که 2,4-D اندام‌زایی را کاهش می‌دهد، همچنین سیرس و دکارد (۱۹۸۲) تأثیر افزایش سطوح مختلف 2,4-D را مبنی بر کاهش اندام‌زایی در گندم گزارش کرد. در آزمایشی مشابه آدام و همکاران (۲۰۰٦) تأثیر 2,4-D در محیط کشت برای تولید پیازچه درگیاه *Dorianthes excelsa* را مورد پژوهش قرار دادند. تولید کالوس از ریزنمونه گل‌آذین سوسن (چنگ، ۱۹۹۹) و (چن، ۲۰۰۵)، القای کالوس در ریزنمونه‌های فلسی ارنیتوگالوم (نایک و نایاک، ۲۰۰۵) و زنبق (بولتنکو و زرامبو، ۲۰۰۵) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف گزارش شده است.

با توجه به اهمیت زیاد گل سوسن در صنعت گل‌کاری و ارزش اقتصادی قابل‌توجه این گل و نیز با در نظر گرفتن مشکلات تکثیر سنتی سوسن، به‌نظر می‌رسد کشت بافت سوسن دارای اهمیت ویژه‌ای باشد.

1- Crimson Beauty

هدف از انجام این طرح، تعیین مناسب‌ترین غلظت هورمونی IAA و 2,4-D در محیط کشت B_5 برای باززایی اندام‌های مختلف مانند پیازچه و ریشه از ریزنمونه‌های جدا شده از قطعات فلس گل سوسن در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد همچنین یکی دیگر از اهداف این پژوهش تولید کالوس می‌باشد که در فرایند اندام‌زایی غیرمستقیم و جنین‌زایی سوماتیکی کاربرد دارد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و منبع ریزنمونه: این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گردید. پس از تهیه پیازهای گل سوسن به‌منظور برطرف کردن نیاز سرمایی به‌مدت ۸-۷ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در پیت مرطوب نگهداری شدند سپس پیازها در گلدان‌های ۳۰ سانتی‌متری کشت و در شرایط گلخانه‌ای شروع به رشد کردند و حدوداً پس از ۲ ماه بوته‌ها گل‌دهی کردند پس از گل‌دهی و متوقف شدن رشد قسمت هوایی گیاه، پیازچه‌های دختری شروع به رشد کرد و ۲ ماه پس از گل‌دهی پیازچه‌های دختری به اندازه مناسب رسیده و به‌عنوان منبع ریزنمونه استفاده گردید.

ضدعفونی مواد گیاهی: به‌منظور ضدعفونی ریزنمونه‌ها، ابتدا لایه‌های خارجی پیاز که قهوه‌ای رنگ و ناسالم بودند توسط شستشو زیر جریان آب حذف شدند. پس از رسیدن به قسمت‌های داخلی و فلس‌های سالم و آب‌دار، فلس‌ها یکی‌یکی از طبق پیاز جدا شد. در این مرحله شاخه گل‌دهنده گیاه که به‌صورت ابتدایی و متراکم در وسط پیاز دیده می‌شد و همچنین تعدادی از فلس‌های داخلی که خیلی نازک بودند حذف شدند. پس از این مرحله فلس‌های جدا شده از پیاز در داخل بشر دارای توری قرار داده شده و به‌مدت ۱ ساعت زیر آب جاری قرار گرفتند تا خاک‌های سطحی فلس‌ها شسته شود. فلس‌ها سپس با چند قطره مایع ظرف‌شویی شستشو و با آب مقطر آب‌کشی شد. پس از این مرحله برای از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه استفاده گردید و پس از انتقال بشر دارای فلس‌ها به زیر هود لامینار و آب‌کشی با آب مقطر ۲ بار استریل، برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی از محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۳۰-۱۵ دقیقه استفاده شد. پس از ضدعفونی، فلس‌ها با آب مقطر ۲ بار استریل در ۳ نوبت آب‌کشی شدند.

تهیه و استقرار ریزنمونه‌ها: پس از ضدعفونی سطحی فلس‌ها، قسمت‌های صدمه‌دیده آن‌ها بریده شده و از قسمت‌های وسط فلس‌ها ریزنمونه‌هایی با مساحت تقریبی ۰/۲۵ سانتی‌مترمربع تهیه گردید. پس از این مرحله ریز نمونه‌ها با استفاده از یک پنس استریل در روی محیط کشت انتقال یافتند و با آرایش افقی روی محیط کشت استقرار یافتند. پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، درب ظروف کشت توسط فویل آلومینیومی و پارافیلم بسته شد.

محیط کشت و شرایط کشت: از محیط کشت پایه B_5 (گامبورگ و همکاران، ۱۹٦۸) تکمیل شده با تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و 2,4-D هر یک شامل ٤ سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و ترکیب متقابل هر یک از این سطوح استفاده شد. همچنین در محیط کشت یاد شده ۲۰ گرم در لیتر ساکارز به‌عنوان منبع کربوهیدرات و ۸ گرم در لیتر آگار برای جامد کردن محیط کشت به‌کار برده شد. قبل از افزودن آگار، pH محیط کشت در ۵/۵ تنظیم شد پس از توزیع محیط کشت در شیشه‌ها به‌منظور ضدعفونی، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع اتوکلاو شدند پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، ظروف کشت در یک اتاقک رشد با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی در روز، شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۵ هفته ریزنمونه‌ها در محیط کشت مربوطه بدون هورمون واکشت شدند. ۵ هفته پس از واکشت نیز به‌منظور به‌دست آوردن داده‌ها، ریزنمونه‌ها بررسی و ارزیابی شدند. در این آزمایش صفاتی مانند طول و تعداد ریشه، طول و تعداد شاخساره، تعداد پیازچه و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری SAS، در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و آزمون مقایسه میانگین LSD در سطح ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در نهایت با استفاده از برنامه Excel نمودارهای مربوط به آن‌ها رسم گردید. برای تعیین روابط بین صفات مورد اندازه‌گیری از ضرایب همبستگی[1] استفاده گردید.

نتایج و بحث

تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر ریشه‌زایی: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر 2,4-D در سطح احتمال ۱ درصد بر طول و تعداد ریشه معنی‌دار بود به‌طوری‌که بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش غلظت این هورمون طول و تعداد ریشه کاهش می‌یابد بنابراین طویل‌ترین و بیش‌ترین ریشه مربوط به تیمار شاهد بوده در حالی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر

1- Corr Procedure

کم‌ترین باززایی ریشه مشاهده شد (جدول ۱). نتایج این آزمایش با نتایج سیرس و دکارد (۱۹۸۲) مطابقت دارد. ایشان بیان کردند که سطوح بالای 2,4-D بر روی اندام‌زایی گندم تأثیر بازدارنده دارد. همچنین نتایج نشان داد که تنظیم‌کننده رشد IAA هیچ تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای ریشه‌زایی نداشت علت این امر را می‌توان به شرایط درونی این رقم از جمله سطوح هورمون‌های داخلی آن نسبت داد به‌نظر می‌رسد در این آزمایش اکسین IAA داخلی موجود در فلس‌ها برای ریشه‌زایی به مقدار کافی وجود داشته است این نتایج با نتایج آزمایش کیم و کیم (۲۰۰۵) انطباق دارد در بررسی‌های این محققان مشخص شد که مقدار IAA در فلس *Lilium casablanca* در طول دوره بلوغ پیازها افزایش می‌یابد و مقدار IAA در فلس‌ها تا ٦٠ روز پس از گل‌دهی به بیش‌ترین مقدار خود وجود دارد. همچنین واروش و همکاران (۲۰۰۱) در پژوهش‌های خود گزارش کرد که در نبود هورمون برون‌زا تشکیل ریشه در *L. nepalens* تحریک نمی‌شود. این نتایج با نتایج این پژوهش مطابقت ندارد با توجه به این‌که در این آزمایش ریزنمونه‌ها بدون هورمون برون‌زا نیز به‌راحتی تعداد قابل‌توجهی ریشه تولید کردند می‌توان نتیجه گرفت که رقم‌های مختلف سوسن دارای سطوح IAA درون‌زای مختلفی هستند و احتمالاً رقم استفاده شده در این آزمایش از نظر ژنتیکی خودکفا از اکسین IAA بوده است یعنی گاهی اوقات اندام کشت شده قادر است اکسین مورد نیاز خود را سنتز و تأمین نماید در این حالت نیازی به اکسین خارجی نخواهد داشت (باقری و صفاری، ۱۹۹۸). از طرفی نات (۱۹۹۸) گزارش کرد که افزایش هورمون NAA به‌طور معنی‌داری تعداد ریشه را در *L. longiflorum* نسبت به محیط کشت بدون هورمون افزایش می‌دهد. نتایج این آزمایش نیز با نتایج این آزمایش مطابقت ندارد علت این امر می‌تواند ماهیت شیمیایی اکسین IAA باشد که هورمونی ناپایدار بوده و به سرعت در برابر نور توسط فتواکسیداسیون از سیستم کشت حذف می‌شود (مشایخی و اکبرپور، ۲۰۰۸). بنابراین احتمال می‌رود مدت زمان لازم برای در تماس بودن ریزنمونه‌ها با این اکسین برای ریشه‌زایی کافی نبوده است و یا در ضدیت با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد برای القاء ریشه‌زایی ناتوان بوده و مقادیر کافی از آن وجود نداشته است همچنین نتایج نشان داد که تأثیر متقابل IAA و 2,4-D نیز بر روی تعداد و طول ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار است بیش‌ترین طول ریشه در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر و بدون 2,4-D به‌دست آمد در حالی‌که در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA هیچ ریشه‌ای تولید نشد همچنین است بیش‌ترین تعداد ریشه در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و بدون 2,4-D به‌دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- جدول مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده 2,4-D بر ریشه‌زایی گل سوسن در محیط کشت B_0.

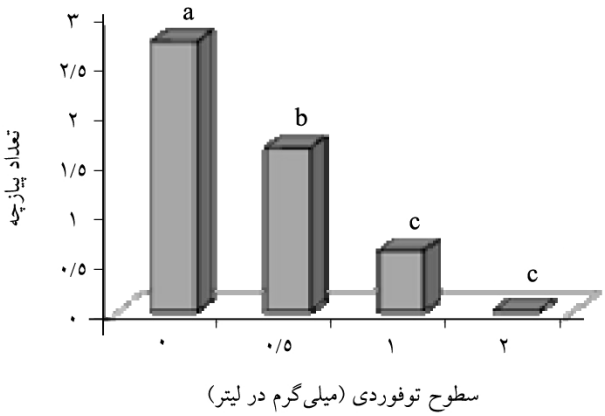
تغییرات	طول ریشه (سانتی‌متر)	تعداد ریشه
(۰ ppm)2,4-D	۰/٦٤[a]	۵/۱۱[a]
(۰/۵ ppm) 2,4-D	۰/۱۲[b]	۱/۵۱[b]
(۱ ppm) 2,4-D	۰/۰۳[c]	۰/۳٤[c]
(۲ ppm) 2,4-D	۰/۰۱[c]	۰/۰۷[c]

* اعداد با حروف غیرمشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری با هم دارند.

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر پیازچه‌زایی: با توجه نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها اثر هورمون ایندول استیک اسید بر تعداد پیازچه معنی‌دار نبود ولی با افزایش آن تعداد پیازچه به کمی افزایش پیدا کرد و بیش‌ترین تعداد پیازچه از تیمار IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد همچنین نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل 2,4-D و IAA در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است به‌طوری بیش‌ترین تعداد پیازچه در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و بدون 2,4-D به‌دست آمد در حالی‌که در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D هیچ پیازچه‌ای تولید نشد (شکل ۱).

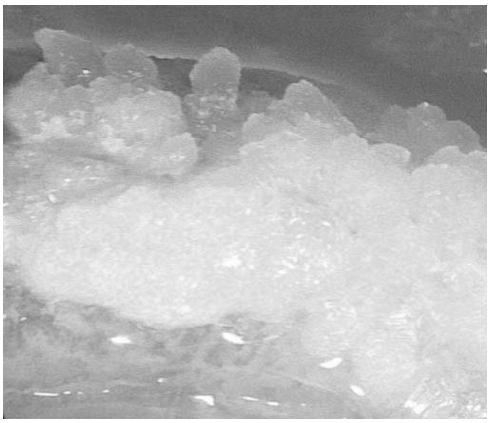
شکل ۱- پیازچه‌زایی از قطعات فلس گل سوسن در محیط کشت B_0 دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA.

استیمارت و آشر (۱۹۷۸) بخش‌هایی از فلس‌های سوسن *Lilium longiflorum* را بر روی محیط کشت LS کشت کردند و نشان دادند که افزودن ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA منتج به تولید بیش‌تر پیازچه از فلس‌های خارجی شد که نتایج این آزمایش با نتایج این آزمایش هم‌سو می‌باشد. همچنین پیریک و استیگمنز (۱۹۷۵) بیان کردند که اکسین‌ها برعکس جیبرلین‌ها پیازچه‌زایی در سنبل را افزایش می‌دهد. پادوزینسکا (۲۰۰۶) نیز به نتایج مشابهی مبنی بر بهبود یافتن تشکیل پیازچه لاله توسط اکسین‌ها دست یافته بود. همچنین نتایج نشان داد که اثر هورمون 2,4-D در سطح احتمال ۱ درصد بر تعداد پیازچه معنی‌دار بوده است همچنین بررسی جدول مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش هورمون 2,4-D تعداد پیازچه‌های تولید شده کاهش می‌یابد به‌طوری‌که بیش‌ترین تعداد پیازچه مربوط به تیمار شاهد بوده و کم‌ترین تعداد نیز در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد (شکل ۲). به‌نظر می‌رسد 2,4-D با غالبیت اثر متقابل با سایر تنظیم‌کننده‌ها رشد مانند سایتوکینین‌ها توانسته است عامل بازدارنده‌ای برای تولید پیازچه باشد (آدام و همکاران، ۲۰۰۶). گرونوالد و همکارانش (۱۹۷۷) بیان کرد که با کاهش غلظت 2,4-D در محیط کشت اثر آنتاگونیستی آن بر توسعه اندام‌زایی کم‌تر می‌شود که این نتایج با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. سیرس و دکارد (۱۹۸۲) نیز به نتایج مشابهی دست یافته بود ایشان بیان کرد که در سطوح بالای 2,4-D اندام‌زایی گندم متوقف می‌شود. نتایج نشان داد که اثر متقابل هورمون 2,4-D و IAA در سطح احتمال ۱ درصد بر تعداد پیازچه معنی‌دار بوده است. بیش‌ترین تعداد پیازچه مربوط به ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و بدون 2,4-D بود.



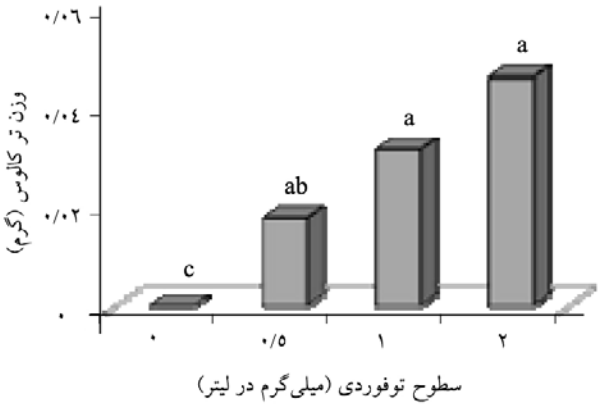
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر تعداد پیازچه به‌دست آمده از قطعات فلس گل سوسن در محیط کشت B_5.

تأثیر تنظیم‌کننده رشد بر کالوس‌زایی: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد کـه 2,4-D در سطح احتمال ۵ درصد بر وزن تر کالوس تأثیر معنی‌داری داشته است. بررسی جدول مقایسه میـانگین (شکل ٤) نیز نشان داد که با افزایش غلظت 2,4-D بر وزن تر کالوس نیز افزوده می‌شود. بیش‌تـرین وزن کالوس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد (شکل ۳) در حالی‌که در محـیط کـشت بـدون این هورمون هیچ‌گونه کالوس‌زایی رخ نداد. کالوس در هفته سوم و چهارم پس از کشت در قـسمت‌هـای بریده شده بافت فلس‌ها شروع به تولید کرد کالوس‌های تولید شده تقریباً به رنگ زرد کم‌رنـگ و روشـن و از نوع کالوس‌های سخت بود طوری‌که موقع جداسازی برای توزین، کالوس‌ها بـه‌صـورت یـک تـوده منسجم بوده و به‌صورت یکپارچه از قسمت چسبیده به بافت فلس جدا می‌شد (شکل ۳).



شکل ۳- کالوس‌زایی قطعات فلس گل سوسن در محیط کشت B_5 دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D.

گزارش‌های فراوانی در مورد کـالوس‌زایـی گیاهـان پیـازی وجـود دارد. چنـگ و همکـاران (۱۹۹۹) گزارش داد که باززایی بهینه کالوس از ریزنمونه گل‌آذین سوسن در محیط کـشت دارای ۳ میلـی‌گـرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. در آزمایشی دیگر توسـط نایـک و نایـاک (۲۰۰۵) القای کالوس در ریزنمونه‌های فلسی ارنیتوگالوم در محیط کشت دارای ٤-۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. بولتنکو و زرامبو (۲۰۰۵) نیز به نتایج مشابهی دسـت یافتـه بـود. چـن (۲۰۰۵) نیز بیان کرد که بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی از کشت بـساک نـرگس در محـیط کـشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA رخ داد. نتایج این آزمایش‌ها تا حدودی با نتایج ایـن پژوهش هم‌سو بوده و به‌نظر می‌رسد 2,4-D همراه با یک سایتوکینین برای کالوس‌زایی مناسب‌تر می‌باشد.



شکل ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر وزن تر کالوس به‌دست آمده از قطعات فلس گل سوسن در محیط کشت B_0.

جدول ۲- اثرات متقابل تنظیم‌کننده‌های رشدی 2,4-D و IAA بر پیازچه‌زایی و ریشه‌زایی در محیط کشت B_0.

IAA (ppm)	2,4-D (ppm)	تعداد پیازچه	طول ریشه (سانتی‌متر)	تعداد ریشه
۰	۰	۲/۱۸^{b}	۰/۷۵^{a}	۵/۷^{a}
	۰/۵	۰/٤٦^{cde}	۰/۱۲^{d}	۰/۸۹^{bc}
	۱	۰/۳۸^{de}	۰/۷۲^{de}	۰/۱٤^{c}
	۲	۰/۱۲^{e}	۰/۷۲^{de}	۰/۲۰^{c}
۰/۵	۰	۱/۷۸^{b}	۰/٤۲^{b}	۳/۸۲^{a}
	۰/۵	٤/۱۲^{a}	۰/۲۷^{c}	٤/۲^{a}
	۱	۰/۵۲^{cde}	۰/۰٤^{de}	۰/۵٤^{bc}
	۲	۰/۰^{e}	۰/۰^{e}	۰/۰^{c}
۱	۰	۲/۵۲^{b}	۰/۵۲^{b}	۵/۷^{a}
	۰/۵	۱/۳۲^{bcd}	۰/۰۷^{de}	۱/٦^{b}
	۱	۱/۲۱^{bcd}	۰/۰٤^{de}	۰/۳۱^{c}
	۲	۰/۲۷^{e}	۰/۰۱^{de}	۰/۱۰^{c}
۲	۰	٤/۷۹^{a}	۰/۹٤^{a}	۵/۳۵^{a}
	۰/۵	۱/٤۰^{bc}	۰/۰٤^{de}	۰/۲۷^{c}
	۱	۰/۵^{cde}	۰/۰۲^{de}	۰/٤٤^{bc}
	۲	۰/٤٦^{cde}	۰/۰^{e}	۰/۰^{c}

* اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری ندارند.

همبستگی بین صفات مورد اندازه‌گیری در محیط کشت B_5: نتایج به‌دست آمده از جدول همبستگی بین صفات نشان داد که بین پارامترهای تعداد پیازچه، طول ریشه و تعداد ریشه همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد. همچنین بین پارامترهای وزن تر کالوس با طول و تعداد ریشه همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد و با تعداد پیازچه همبستگی منفی و غیرمعنی‌داری مشاهده گردید. بیش‌ترین ضریب همبستگی (r=۸۷ درصد) مربوط به تعداد ریشه با طول ریشه و کم‌ترین ضریب همبستگی (r=-۱۷ درصد) مربوط به وزن تر کالوس با تعدد پیازچه بود. نتایج به‌دست آمده از همبستگی این صفات با نتایج آزمایش گرونوالد و همکاران (۱۹۷۷) مطابقت دارد ایشان بیان کردند که با افزایش کالوس‌زایی، اندام‌زایی کم‌تر می‌شود. همچنین تعداد پیازچه ارتباط مستقیمی با تعداد گره‌های تشکیل شده در هر ریزنمونه دارد با توجه به این‌که در هر گره تعدادی ریشه نیز تولید می‌شود می‌توان گفت که با افزایش تعداد پیازچه در هر ریزنمونه تعداد ریشه نیز افزایش می‌یابد (جدول ۳).

جدول ۳- همبستگی بین صفات مورد اندازه‌گیری در محیط کشت B_5.

تغییرات	طول ریشه	تعداد ریشه	تعداد پیازچه	وزن تر کالوس
طول ریشه	۱			
تعداد ریشه	۰/۸۷**	۱		
تعداد پیازچه	۰/۷۱**	۰/۷۸**	۱	
وزن تر کالوس	-۰/۲۸*	-۰/۳۱*	-۰/۱۷ns	۱

* معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

منابع

1. Adam, M.D., Rob, C., Rebecca, F., Paul W. and Taylo, J. 2007. Micropropagation of Gymea Lily (Doryanthes excelsa Correˆa) from New South Wales, Australia. Plant Cell Tiss Organ Cult. 88: 157-165.
2. Bagheri, A. and Saffari, M. 1998. In vitro culture of higher plants. Mashhad Univ. Press, 6: 86-91.
3. Boltenkov, E.V. and Zarembo, E.V. 2005. In vitro regeneration and callogenesis in tissue culture of floral organs of the genus Iris (Iridaceae). Biology Bulletin, 32: 2. 138-142.

4.Chang, C., Chang-Tesrn, C., Tsai, Y.C. and Wei-Chin, C. 1999. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. Var. glorisoides Baker. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 41: 2. 139-142.
5.Chen, L.J., Zhu, X.Y., Gu, L. and Wu, J. 2005. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (Narcissus tazetta L. var. chinensis Roem). Plant Cell Rep. 24: 401-407.
6.Ekrami, T. 1980. Ornamental bulbous plants. Tehran Univ. Press, Pp: 13-29.
7.Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Notrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
8.Groenewald, E.G., Wessels, D.C.J. and Koeleman, A. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiol, 81: 369-373.
9.Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., JR. and Geneve, R.L. 1997. Plant propagation: Principles and practices. 6th ed. Prentic-Hall International, INC, Pp: 203-205.
10.Hasandokht, M. and Ebrahimi, R. 2006. Principle of plant tissue culture. Marze danesh. Press.
11.Kim, K.J. and Kim, K.S. 2005. Changes of endogenous growth substances during bulb maturation after flowering in *Lilium* Oriental Hybrid ‘Casa Blanca'. Acta Horticulturae, 673: 661-665.
12.Kumar, S., Kashyap, M. and Sharma, D.R. 2005. In vitro regeneration and bulblet growth from lily bulbscale explants as affected by retardants, sucrose, and irradiance. Biological Plantarum, 48: 4. 629-632.
13.Mashayekhy, K. and Akbarpour, V. 2007. Plant somatic emberyogenesis. Assis. Prof. of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 483p.
14.Naik, P.K. and Nayak, S. 2005. Different modes of plant regeneration and factors affecting *in vitro* bulblet production in *Ornithogalum virens*. Science Asia, 31: 409-414.
15.Nhut, D.T. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Rep. 17: 913-916.
16.Novak, F.J. and Petru, E. 1981. Tissue culture of Lilium hybrids. Sci. Hort. 14: 191-199.
17.Pierik, R.L. and Steegmans, H.M. 1975. Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and etephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb scale segments of hyacinth. Physiol. Plant. 34: 14-17.
18.Podwyszynska, M. 2006. Improvement of bulb formation in micropropagted tulips by treatment with NAA and pacleobutrazol or accymidol. Acta Hort. 725: 679-684.
19.Sears, R.G. and Deckard, E.L. 1982. Tissue culture variability in wheat; callus induction and regeneration. Crop Sci. 22: 546-550.

20.Stimart, D.J. and Ascher, D.D. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 103: 182-184.
21.Takayama, S. and Misaula, M. 1982. Regulation of organ formation by citokinin and auxin in Lilium bulbscales growth *in vitro*. Plant and cell Physiol. 23: 1. 67-74.
22.Wawrosch, C., Malla, P.R. and Kopp, B. 2001. Clonal propagation of *Lilium nepalense* D. Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Reports*, 20: 4. 285-288.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 18(1), 2011
www.gau.ac.ir/journals

The influence of B_5 basal medium on morphological behavior of Lily (*Lilium longiflorum)* bulbscale *in vitro*

***N. Izadi[1], K. Mashayekhi[2], E. Chamani[3] and B. Kamkar[4]**
[1]M.Sc. Graduated, Dept. of Horticulture Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Horticulture Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Horticulture Science, Mohaghegh Ardebily University, [4]Assistant Prof., Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 2008/11/05; Accepted: 2011/03/15

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of *in vitro* and regeneration of lily (*Lilium longiflorum*) bulb scale by different plant growth regulators in B_5 medium in a completely randomized design with factorial arrangement and 4 replications. Treatments consisted of indole-3-acetic acid (IAA) and 2,4-D in B_5 medium in four concentrations (0, 0.5, 1, 2 mg/lit) and these were combined to medium. Evaluation of results indicated that with increasing of IAA concentration, number of bulblets increased significantly but between using of various IAA concentrations and rooting parameters and callus formation, no significant difference was observed. With increasing of 2,4-D concentration to 2 ppm, callus fresh weight was enhanced, whereas with increasing of 2,4-D concentration, organogenesis suppressed completely. According to the results, about 100-150 plantlet were achieved per adult bulb of lily.

Keywords: Lily, Bulb-scale, Organogenesis, Callus, Medium

* Corresponding Author; Email: izadi03@yahoo.com