Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 4, Winter 2018 (845-854)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.140445.919

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۶ (ص ۸۵۴-۸۴۵)

بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد و امواج فراصوت بر ریشه‌زایی و پینه‌زایی سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Bioss.) در شرایط درون‌شیشه‌ای

زهرا عظیم‌زاده[۱]، مهدی محب‌الدینی[۲*] و اسماعیل چمنی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۷)

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر تیمار NAA و BA و امواج فراصوت بر ریشه‌زایی و پینه (کالوس)زایی ریزنمونه‌های سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Bioss.) در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. برای این منظور ریزنمونه‌های فلس پس از قرارگیری در حمام فراصوت با بسامد (فرکانس) ۳۵ کیلوهرتز با زمان‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ثانیه، در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و BA به‌تنهایی و یا به‌صورت ترکیب با یکدیگر کشت شد. این تحقیق در چهار آزمایش جداگانه به ترتیب شامل ترکیب NAA و BA، NAA و فراصوت، BA و فراصوت و بهترین تیمارهای آزمایش اول همراه با فراصوت انجام گرفت. در آزمایش اول و دوم تیمار NAA ۱mg l^{-1} بیشترین شمار ریشه و طول ریشه را داشت و در آزمایش سوم تیمار شاهد نتیجهٔ بهتری در این زمینه داشت. در آزمایش دوم فراصوت ریشه‌زایی را تحریک نکرد، بااین‌حال در آزمایش سوم، در غلظت پایین BA فراصوت تأثیر مثبتی در ریشه‌زایی داشت و شمار ریشه‌های به‌دست‌آمده را تا ۱۲-۱۰ عدد افزایش داد، ولی در غلظت ۰ و BA ۱ mg l^{-1}، تأثیر مثبتی در ریشه‌زایی نداشت. نتایج مربوط به پینه‌زایی نشان داد، تنظیم‌کننده‌های رشد و امواج فراصوت تأثیر معنی‌داری بر میزان پینه‌زایی ریزنمونه نداشتند. در این پژوهش غلظت ۱mg l^{-1} NAA به‌تنهایی بهترین تیمار برای افزایش فراسنجه (پارامتر)های مربوط به ریشه‌زایی ریزنمونهٔ فلس شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: ریزنمونه، فلس، BA، NAA.

Effects of plant growth regulators and ultrasound treatments on *in vitro* rooting and callogenesis of *Lilium ledebourii* Boiss.

Zahra Azimzadeh[1], Mehdi Mohebodini[2*] and Esmaeil Chamani[3]
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Assistant Professor and Assocaite Professor, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
(Received: Jul. 11, 2016 - Accepted: Sep. 28, 2016)

ABSTRACT

This study was performed to evaluate the effect of NAA, BA and ultrasound waves on *in vitro* rooting and callus induction of *Lilium ledebourii*. For this purpose, scale explants after exposure to an ultrasonic bath with a frequency of 35 kHz in times 0, 5, 10, 20 and 30 seconds were cultured on MS medium containing different concentrations (0, 0.01, 0.1 and 1 mg l^{-1}) of NAA and BA alone or in combination with each other. This study was carried out in four experiments including combination of NAA and BA, NAA and ultrasound, BA and ultrasound, and the best treatments which achieved from first experiment with ultrasound, respectively. In the first and second experiment, 1 mg l^{-1} NAA treatments had the highest root induction and in the third experiment control treatment had the better result. In the second experiment, ultrasound did not stimulate root induction, however, in the third experiment, in 0 and 1 mg l^{-1} BA concentrations, ultrasound had no positive effect on root induction, but at low concentrations, BA increased the number of roots. Moreover, it was indicated that plant growth regulators and ultrasound had no significant effect on callus induction. In this study, concentration of 1 mg l^{-1} NAA was the best treatment for increasing of rooting parameters in scale explants.

Keywords: BA, NAA, explant, scale.

* Corresponding author E-mail: mohebodini@uma.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium ledebourii* (Baker) Bioss. گیاهی از تیرهٔ Liliaceae و از گونه‌های خودروی جنس سوسن است که در بخش‌های شمالی ایران می‌روید (Memar-Moshrefi, 2002) و به‌شدت در معرض خطر انقراض است. این گیاه سوخ تخم‌مرغی یا کروی پوشیده از فلس‌های مایل به زرد و سرنیزه‌ای ریشه‌های نابه‌جا دارد (Farsam *et al*., 2003). برای افزایش رویشی گیاهان سوخدار، ریزازدیادی به‌عنوان مؤثرترین روش استفاده شده است. فلس‌های سوخ سوسن قابلیت و ظرفیت باززایی بالایی دارند، بنابراین آن‌ها به‌طور عمده به‌عنوان ریزنمونه برای افزایش رویشی استفاده می‌شوند (Kanchanapoom *et al*., 2011). تنظیم‌کننده‌های رشد می‌توانند بر هر فرایند یا واکنش فیزیولوژیکی اثر تحریک‌کننده و یا بازدارنده داشته باشند و تأثیر آن‌ها بستگی به مرحلهٔ نمو سوخ یا گیاه و غلظت مورد استفاده دارد (Naseri & Ebrahimi-Garvi, 1998). سیتوکینین‌ها با اکسین در یک فعل‌وانفعال پیچیده به‌منظور مهار (کنترل) تقسیم یاخته‌ای و تمایز اثر متقابل دارند. اکسین‌ها به‌طورمعمول باعث رشد طولی یاخته، طویل شدن بافت‌ها، تقسیم یاخته‌ای (تشکیل پینه یا کالوس) و تشکیل ریشه‌های نابجا، جلوگیری از تشکیل شاخه‌های نابه‌جا و جانبی می‌شوند (Bageri & Saffari, 2007). در بررسی که روی سوسن چلچراغ انجام شد، گزارش شد که بیشترین شمار ریشه و طول ریشه مربوط به غلظت BAP ۰/۵ mg l^{-1} و NAA ۰/۰۱ mg l^{-1} بود (Azadi & Mojtahedi, 2009) و در نتایج پژوهش دیگری روی این گیاه بیشترین درصد ریشه‌زایی از تیمارهای شاهد و BAP ۰/۰۱ mg l^{-1} و نیز NAA ۰/۱ mg l^{-1} به‌دست‌آمده بود (Memar-Moshrefi, 2002). در نتایج تحقیق دیگری بیشترین شمار ریشه در سوسن چلچراغ از غلظت BA ۰/۰۱ mg l^{-1} و NAA ۰/۱ mg l^{-1} به‌دست‌آمده بود و هنگامی‌که غلظت BA صفر بود، با افزایش غلظت NAA شمار ریشه افزایش‌یافته بود. در دیگر غلظت‌های BA در ترکیب با NAA نیز بالاترین شمار ریشه در غلظت NAA ۰/۱ mg l^{-1} مشاهده‌شده بود (Padasht-Dahkaei *et al*., *2008*). همچنین بیشترین فراسنجه‌های ریشه‌دهی از کشت فلس سوسن چلچراغ، در محیط کشت MS حاوی NAA mg l^{-1} ۰/۱ و BA ۰/۱ mg l^{-1} به‌دست‌آمده بود (Azadi & Khosh-Khui, 2007). در آزمایشی که در آن فلس‌های سوسن *L. longiflorum* روی محیط کشت B_5 حاوی غلظت‌های مختلف IAA و 2,4-D کشت‌شده بود، هیچ تفاوت معنی‌داری بین استفاده از غلظت‌های مختلف IAA و فراسنجه‌های ریشه‌زایی و پینه‌زایی مشاهده نشد و با افزایش غلظت 2,4-D تا ۲ mg l^{-1} از شمار و طول ریشه کاسته شد، اما وزن تر پینه افزایش یافت (Izadi *et al*., 2011).

سطوح هورمون درون‌زای گیاهی، نقش مهمی را در اندام‌زایی و نمو درون‌شیشه‌ای گیاه بازی می‌کند و نتایج برخی بررسی‌ها نشان می‌دهد، سطوح هورمون درون‌زا می‌تواند از طریق هردو تنش محیطی زیستی و غیر زیستی تنظیم شود (Tatari-Varnusfaderani *et al*., 2007). از جمله تنش‌های محیطی غیر زیستی می‌توان به امواج فراصوت اشاره کرد. امواج فراصوت، بسامد (فرکانس)های صوتی در محدودهٔ غیر شنیداری برای انسان (به‌طورمعمول از ۱۰۰-۲۰ کیلوهرتز) هستند. در بیشتر کاربردهای آن در کشت بافت گیاهی، فراصوت با صوت‌زاهای حمام آب تولید می‌شود (Gaba *et al*., 2006). تأثیر زیستی (بیولوژیکی) فراصوت به‌طور عمده شامل تأثیر گرمایی و تأثیر حفره‌سازی (کاویتاسیون، cavitation) است و به‌عنوان یک تنش ثانویه روی یاخته‌ها و بافت‌ها عمل می‌کند (Liu *et al*., 2003b). امروزه توجه به تأثیر سودمند و قابلیت کاربردهای فراصوت به‌ویژه در دامنهٔ شدت کم، در سامانه‌های زیستی و فرایندهای مبتنی بر زیست‌فناوری افزایش‌یافته است. تحریک با فراصوت می‌تواند رشد و افزایش بافت‌ها یا یاخته‌ها را تحریک یا بازدارد و زمان تحریک نیز نقش مهمی را در این زمینه بازی می‌کند (Liu *et al*., 2003a). همچنین بسامد و میزان انرژی مورد نیاز برای تأثیر تیمار فراصوت، به‌طور گسترده بین گونه‌ها و رقم‌ها متغیر است. به دنبال قرارگیری در معرض سطوح غیر

Archive of SID

www.SID.ir

مرگ‌آور فراصوت، بسیاری از گیاهان تغییر در ویژگی‌های بافت‌های مختلف را نشان داده‌اند (Ananthakrishnan *et al.*, 2007). نتایج آزمایش‌های انجام‌گرفته روی پینهٔ گیاهان صبرزرد (آلوئه) درختی و داوودی نشان داد، تیمار پینه با امواج فراصوت، رشد پینه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (Liu *et al.*, 2003a ؛ Bochu *et al.*, 2004). تأثیر امواج فراصوت همراه با کاربرد هورمون اکسین، بر سرعت ریشه‌زایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین شمار و طول ریشه‌های قلمه‌های گل محمدی گزارش شده است (Bina & Zamani, 2009). بااین‌حال تاکنون بررسی برای ارزیابی تأثیر امواج فراصوت بر گیاه سوسن انجام نشده است.

با توجه به اهمیت افزایش درون‌شیشه‌ای سوسن چلچراغ و ارزش اقتصادی که این گل می‌تواند داشته باشد، کاربرد امواج فراصوت به‌عنوان یک محرک فیزیکی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌عنوان محرک شیمیایی، در صورت مؤثر بودن بر باززایی ریشه و در نتیجه استقرار بهتر گیاهچه‌ها پس از انتقال به خاک و نیز تولید پینه که در فرایند اندام‌زایی غیرمستقیم و جنین‌زایی بدنی (سوماتیکی) کاربرد دارد، می‌تواند در ریزازدیادی این گیاه بومی ارزشمند مؤثر باشد. در همین راستا در این تحقیق، تأثیر امواج فراصوت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پینه‌زایی و ریشه‌زایی فلس سوسن چلچراغ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سوخ‌های گل سوسن چلچراغ در فصل تابستان از رویشگاه طبیعی آن در منطقهٔ خانقاه اردبیل برداشت شد و پس از انجام عملیات ضدعفونی در آزمایشگاه، در محیط کشت MS (Murashig & Skoog, 1962) پرآوری شد. تحقیق در قالب چهار آزمایش جداگانه طراحی و اجرا شد. آزمایش‌ها با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد (BA و NAA) و یک تنش محیطی غیر زیستی (فراصوت) به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شدند. آزمایش اول شامل دو عامل BA و NAA، آزمایش دوم شامل دو عامل NAA و فراصوت، آزمایش سوم شامل دو عامل BA و فراصوت، آزمایش چهارم شامل دو عامل بهترین ترکیب‌های هورمونی برای ریزادیادی همراه با فراصوت بود. برای انجام پژوهش، فلس‌های کناری و میانی سوخ‌های رشد یافته در محیط MS که برای افزایش مناسب است (Marinangeli *et al.*, 2003) به‌عنوان ریزنمونه جدا شد و آنگاه درون لوله‌های فالکون پلاستیکی حاوی آب مقطر سترون (استریل) ریخته و سر آن‌ها با پنبه و درپوش پلاستیکی و کشیدن سلفون مسدود شد. برای فراصوت‌دهی به ریزنمونه‌ها، لوله‌ها درون دستگاه حمام فراصوت (مدل BANDELIN) با بسامد ۳۵ کیلوهرتز و در زمان‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ثانیه قرار گرفتند و سپس برای کشت، به درون هود لامینار منتقل شد. پس از خالی کردن آب درون لوله‌های فالکون، ریزنمونه‌ها درون پتری دیش ریخته شده و بسته به تیمارهای مورد آزمایش در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت MS تکمیل‌شده با تنظیم‌کنندهٔ رشد BA یا NAA هرکدام در چهار غلظت ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کشت شد. سپس کشت‌های انجام شده در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۳ درجهٔ سلسیوس و تحت ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از گذشت سه ماه، صفات ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) مربوط به پینه‌زایی و ریشه‌زایی شامل وزن تر پینه، شمار ریشه‌ها، میانگین شمار ریشه در هر سوخک، شمار سوخک‌های ریشه‌دار شده و میانگین طول ریشه‌ها ارزیابی شد. تجزیهٔ واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 صورت گرفت و مقایسهٔ میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

در آزمایش اول، غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BA (هرکدام در چهار سطح ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، برای تعیین بهترین ترکیب هورمونی برای ریشه‌زایی و پینه‌زایی ریزنمونهٔ فلس

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی شد. در این آزمایش، تیمار ۰ + ۰ mg l^{-1} NAA + ۱ mg l^{-1} BA به علت از بین رفتن ریزنمونهٔ شماری از تکرارها، در تجزیهٔ آماری حذف شد. بنابراین داده‌ها به‌صورت ترکیب تیماری در قالب طرح کامل تصادفی تجزیه شد. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد، تأثیر ترکیب‌های تیماری مختلف بر صفات شمار ریشه‌ها، شمار سوخک‌های ریشه‌دار شده، میانگین شمار ریشه در هر سوخک و میانگین طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد، اما تأثیر ترکیب‌های تیماری NAA و BA بر وزن تر پینه معنی‌دار نبود (داده‌ها نشان داده نشده است). گزارش‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌های انجام شده روی سوسن‌های مختلف با ریزنمونه‌های مختلف نشان دادند، اضافه کردن مواد تنظیم‌کنندهٔ رشد به محیط کشت، باعث تحریک تشکیل پینه در ریزنمونه می‌شود (El-Naggar *et al*., 2012; Torang & Magsodi, 2012; Kanchanapoom *et al*., 2011; Tang *et al*., 2010; Robert-Ault & Siqueira, 2008; Khavar *et al*., 2005; Chang *et al*., 2000). هرچند در این آزمایش نیز غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد باعث القای تشکیل پینه در ریزنمونه شد، اما از نظر آماری تأثیر معنی‌داری بر پینه‌زایی نداشتند.

مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان داد، بیشترین شمار ریشه‌های تولیدشده در ترکیب‌های هورمونی ۰/۱ mg l^{-1} NAA و صفر mg l^{-1} BA +۱ mg l^{-1} NAA، ۰/۱ mg l^{-1} BA + ۰/۱ mg l^{-1} NAA +۰/۱ mg l^{-1} BA و ۰/۰۱ mg l^{-1} NAA + ۰/۰۱ mg l^{-1} BA به دست آمد. محیط کشت MS حاوی ۰/۱ mg l^{-1} NAA، ۰/۰۱ mg l^{-1} BA + ۰/۰۱ mg l^{-1} NAA + ۰/۰۱ mg l^{-1} BA و ۰ mg l^{-1} BA + ۱ mg l^{-1} NAA نیز بیشترین شمار سوخک‌های ریشه‌دار را داشتند که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین شمار ریشه‌ای که در هر سوخک تولید شد به ترتیب در تیمارهای ۱ mg l^{-1} NAA، ۰/۰۱ mg l^{-1} BA + ۱ mg l^{-1} NAA + mg l^{-1} BA صفر و ۰/۰۱ mg l^{-1} NAA + ۰ بود. همچنین بلندترین طول ریشه‌ها در ترکیب تیماری ۰ mg l^{-1} BA + ۱ mg l^{-1} NAA مشاهده شد که با تیمار شاهد و تیمارهای ۰/۰۱ mg l^{-1} NAA + ۰ mg l^{-1} BA، ۰/۱ mg l^{-1} NAA + ۰/۰۱ mg l^{-1} BA و ۰/۱ mg l^{-1} BA+۰/۱ mg l^{-1} NAA اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱). این نتایج با گزارش Bageri & Saffari (2007) دربارهٔ نتایج تأثیر غلظت بالای اکسین، در تشکیل ریشه‌های نابجا و توسعهٔ اولیهٔ آن همخوانی دارد، اما در مورد تأثیر غلظت پایین اکسین در طویل شدن ریشه‌ها همخوانی نداشت. در پژوهش‌های انجام شده، محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد، تشکیل ریشه را در *L. nepalense* القا نکرد (Wawrosch *et al*., 2001)، بااین‌حال در این آزمایش ریزنمونه‌ها بدون هورمون بیرونی نیز ریشه‌دار شدند که این امر می‌تواند نشان‌دهندهٔ این موضوع باشد که بوم‌جور (اکوتیپ) استفاده شده در این آزمایش از نظر ژنتیکی اکسین درون‌زا دارد؛ زیرا گاهی اندام کشت‌شده می‌تواند اکسین مورد نیاز خود را تا حدودی ساخت (سنتز) کند، در این حالت نیازی به اکسین خارجی نخواهد داشت (Bageri & Saffari, 2007). با اینکه سیتوکینین در ترکیب با غلظت ۰ و ۱ mg l^{-1} NAA اثر بازدارندگی در ریشه‌زایی داشت، اما در غلظت پایین NAA وجود BA با غلظت پایین مؤثر بود. در همهٔ سطوح NAA با افزایش غلظت BA طول ریشه کاهش یافت، به‌جز غلظت ۰/۱ mg l^{-1} NAA که غلظت‌های پایین BA در ترکیب با آن طول ریشه را افزایش داد. در پژوهشی که توسط Padasht Dahkaei *et al*. (2008) انجام شده بود، بیشترین شمار ریشه در سوسن چلچراغ از غلظت ۰/۰۱ mg l^{-1} BA و NAA ۰/۱ mg l^{-1} به دست آمد. هنگامی‌که غلظت BA ۰ بود، با افزایش غلظت NAA شمار ریشه افزایش یافت. در دیگر غلظت‌های BA در ترکیب با NAA نیز بالاترین شمار ریشه در غلظت ۰/۱ mg l^{-1} NAA مشاهده شد. در نتایج پژوهش دیگری، بیشترین فراسنجه‌های ریشه‌دهی از کشت فلس سوسن چلچراغ، در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ mg l^{-1} NAA و ۰/۱ mg l^{-1} BA به‌دست‌آمده بود (Azadi & Khosh-Khui, 2007). با وجود اینکه در آزمایش‌های یادشده غلظت بالاتر از NAA ۰/۱ mg l^{-1} استفاده نشده بود، نتایج این پژوهشگران با نتایج این تحقیق همخوانی داشت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. مقایسهٔ میانگین تأثیر ترکیب‌های تیماری NAA و BA بر ریشه‌زایی در ریزنمونهٔ فلس

Table 1. Comparison of mean of NAA and BA combinations effects on root induction in scale explant

NAA concentration ($mg\ l^{-1}$)	BA concentration ($mg\ l^{-1}$)	Number of roots	Number of rooted bulbs	Average number of root per bulb	Average length of roots (mm)
0	0	11.25^{cd}	4^{b}	2.97^{bc}	14.25^{abc}
	0.01	6.75^{cde}	4.25^{bc}	1.75^{cd}	7.25^{cde}
	0.1	0^{e}	0^{d}	0^{d}	0^{g}
0.01	0	13.5^{c}	4.5^{b}	3.17^{abc}	16^{ab}
	0.01	31.5^{ab}	12^{a}	2.3^{bcd}	11.5^{bcd}
	0.1	1.75^{e}	0^{d}	0^{d}	1.75^{fg}
	1	1^{e}	0^{d}	0^{d}	2^{fg}
0.1	0	14.75^{c}	2.25^{bcd}	1.42^{cd}	6.25^{def}
	0.01	31^{ab}	12.5^{a}	2.3^{bcd}	14^{abc}
	0.1	35.33^{ab}	3^{bcd}	1.03^{cd}	16.66^{ab}
	1	6^{cde}	0.33^{cd}	3^{bcd}	3.33^{efg}
1	0	45.5^{a}	9.25^{a}	5^{ab}	21.75^{a}
	0.01	27.25^{b}	4.25^{b}	6.35^{a}	12^{bcd}
	0.1	4.25^{de}	0.5^{cd}	2.12^{cd}	1.75^{fg}
	1	0^{e}	0^{d}	0^{d}	0^{g}

میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

Means with same letters are not significantly different at $p< 0.05$.

در آزمایش دوم، غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد NAA (در چهار سطح ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و زمان‌های مختلف قرارگیری در معرض امواج فراصوت (در پنج سطح ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ثانیه) برای ریشه‌زایی و پینه‌زایی فلس سوسن چلچراغ بررسی شد. در این آزمایش به دلیل اثر امواج فراصوت، پس از مدتی شماری از ریزنمونه‌های فلس از بین رفت که این تیمارها در تجزیهٔ داده‌ها حذف شد. بنابراین داده‌ها به‌صورت ترکیب تیماری در قالب طرح کامل تصادفی تجزیهٔ آماری شد. ممکن است که اندازهٔ فلس‌های جداشده برای کشت و یا محل قرارگیری آن‌ها روی سوخ و یا شمار فلس در هر لولهٔ فالکون به هنگام فراصوت‌دهی، در مقاومت آن‌ها در مقابل امواج فراصوت دخیل باشد. بر پایهٔ گزارش‌های به‌دست‌آمده، هنگامی بافت‌های مختلف گیاهی که حاوی کانال‌های پر گاز درون‌یاخته‌ای هستند در معرض ارتعاش‌های امواج فراصوت قرار می‌گیرند، ارتعاش کانال‌ها نابسامانی‌هایی را در مقیاس میکروسکوپی ایجاد می‌کند که عبارت‌اند از ریزجریان‌های صوتی در یاخته‌های گیاهی که می‌تواند ساختار یا عملکرد عادی یاخته را مختل کند (Miller, 1983). در نتایج بررسی گزارش شده است، فراصوت، فراساختار یاخته‌ها مانند غشای یاخته‌ای، ساختار (اسکلت) یاخته‌ای، کلروپلاست‌ها و میتوکندری را می‌تواند تخریب کند (Liu *et al*., 2003a). اثرگذاری برگشت‌ناپذیر فراصوت به نظر می‌رسد که به مرگ یاخته‌ای محدود شود که در این بررسی در مورد ریزنمونه‌های فلسی دیده شد.

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد، اثر متقابل ترکیب‌های NAA و فراصوت بر صفات شمار ریشه‌ها، میانگین شمار ریشه در هر سوخک، شمار سوخک‌های ریشه‌دارشده و میانگین طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین بر پایهٔ تجزیهٔ واریانس داده‌ها، تأثیر ترکیب‌های تیماری بر مقادیر وزن پینه معنی‌دار نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). نتایج آزمایش‌های انجام‌گرفته روی پینهٔ گیاهان صبرزرد و داوودی نشان داده بود که تیمار پینه با امواج فراصوت، رشد پینه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (Liu *et al*., 2003a; Bochu *et al*., 2004). تحقیقات صورت گرفته در این زمینه نشان داده است، موج صوتی موجب افزایش سطوح IAA درون‌زا و کاهش ABA و در نتیجه مهار رشد پینه می‌شود (Bochu *et al*., 2004). در سیب‌زمینی، پس از فراصوت‌دهی و کشت شماری از ریزنمونه‌های سالم زنده روی محیط کشت حاوی کینتین و D- ۴و۲، تشکیل پینه تا ۴۲درصد افزایش یافت، درحالی‌که بدون فراصوت تنها تا ۲۴درصد پینه‌زایی داشت. همچنین در گندم سیاه، ریزنمونه‌هایی که درون لولهٔ سترون‌شده (استریل) با محیط مغذی MS تغییریافته با اضافه کردن عامل‌های رشد D- ۴و۲ (برای تشکیل پینه) و کینتین قرار داده

Archive of SID

www.SID.ir

شدند، تشکیل پینه تا ۴۰درصد در آن‌ها افزایش یافت (Lamberova *et al*., 2006). نتایج این تحقیق با نتایج این گزارش‌ها همخوانی نداشت این نتیجه ممکن است به علت تفاوت در نوع گیاه و نوع بافت فراصوت داده شده، تفاوت در مدت و شدت فراصوت و شرایط فراصوت‌دهی باشد.

مقایسهٔ میانگین داده‌ها برای اثر متقابل تیمارهای NAA و امواج فراصوت نشان داد، بیشترین شمار ریشه‌های تولیدشده از تیمار NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۰ ثانیه فراصوت‌دهی به دست آمد که با تیمار NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۵ ثانیه فراصوت‌دهی و NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱). همچنین بیشترین شمار ریشه در هر سوخک مربوط به تیمار NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۰ ثانیه فراصوت‌دهی بود که با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). افزایش شمار ریشه در حضور NAA، با انتظاری که از تأثیر اکسین‌ها بر ریشه‌زایی وجود دارد همخوانی داشت. در گیاه *L. longiflorum* گزارش شده است که اضافه کردن NAA به‌طور قابل‌توجهی شمار ریشه را در مقایسه با محیط کشت بدون هورمون افزایش می‌دهد (Nhut, 1998). در همهٔ بررسی‌های انجام‌شده روی تشکیل سوخک با استفاده از روش لایه‌های یاخته‌ای نازک (TCL)، محیط کشت MS نصف غلظت حاوی NAA µM ۲/۷-۱ یا IBA µM ۱۰ و ساکارز در غلظت $g\ l^{-1}$ ۳۰- ۲۰ برای ریشه‌زایی شاخه‌ها، سوخک‌ها و سوخک‌های کاذب استفاده شده بود (Teixeira-da-Silva *et al*., 2007). نتایج آزمایشی که روی فلس‌های سوخ *L. candidum* انجام شد، نشان داد، سوخک‌های باززایی‌شده روی محیط کشت MS حاوی NAA $mg\ l^{-1}$ ۰/۵ به‌طور موفقیت‌آمیز ریشه‌دار شدند (Khavar *et al*., 2005). نتایج این پژوهش‌ها با نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مبنی بر نقش اکسین‌ها در ریشه‌زایی همخوانی داشت. Tatari-Varnusfaderani *et al.* (2007) در نتایج بررسی‌های خود بیان کردند، در سوسن چلچراغ و دورگ آسیایی، بیشترین شمار ریشه در محیط کشت حاوی NAA $mg\ l^{-1}$ ۰/۱ به دست آمد. همچنین در پژوهش دیگری روی سوسن چلچراغ، غلظت‌های ۰/۱ و NAA $mg\ l^{-1}$ ۰/۰۵ سبب افزایش درصد ریشه‌زایی و شمار ریشه شد (Memar-Moshrefi, 2002). در آزمایشی که روی *L. longiflorum* انجام شد، محیط کشت MS با NAA $mg\ l^{-1}$ ۲، در مقایسه با تیمارهای دیگر برای ریشه‌زایی و داشتن بیشترین ریشه‌زایی، بیشترین شمار ریشه‌ها و بالاترین طول ریشه خیلی مؤثر بود (Mir *et al*., 2012). در تحقیقی که به‌منظور باززایی سوخک‌ها از ریزنمونه‌های گرهٔ سوسن‌های دورگ (هیبرید) در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شده بود، مؤثرترین غلظت در تولید ریشه از سوخک‌های باززایی‌شده ۱ یا IBA $mg\ l^{-1}$ ۲ بود (Kapoor *et al*., 2009). بیشترین شمار ریشه در *L. regale* در محیط کشت حاوی IBA $mg\ l^{-1}$ ۲ به‌دست‌آمده بود، اگرچه طول ریشه‌ها خیلی کوچک بود و برای انتقال به گلخانه مناسب نبود. بااین‌حال هنگامی IBA با NAA جایگزین شد، در غلظت NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ درصد ریشه‌زایی ۹۸ درصد بود (Saifulah *et al*., 2010). نتایج این پژوهشگران مبنی بر تأثیر بیشترین غلظت اکسین استفاده‌شده در آزمایش بر ریشه‌زایی با نتایج این تحقیق همخوانی داشت. همچنین در نتایج پژوهشی برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌های *L. leucanthum*، محیط کشت MS، نصف غلظت با NAA $mg\ l^{-1}$ ۰/۰۵ مناسب‌تر گزارش شد (Tang *et al*., 2010) که با نتایج این پژوهش مغایر بود. تفاوت نژادگان (ژنوتیپ)، سن و نوع ریزنمونه، محل گردآوری گیاه (Tatari-Varnusfaderani *et al*., 2007) و نیز تفاوت نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و همچنین امواج فراصوت استفاده شده در این آزمایش همگی می‌توانند از دلایل نبود تطابق غلظت بهینهٔ گزارش‌های یادشده با نتایج این تحقیق باشند. بر پایهٔ مقایسهٔ میانگین داده‌ها در این آزمایش، بیشترین شمار سوخک‌های ریشه‌دارشده از تیمار NAA $mg\ l^{-1}$ ۰/۰۱ + ۵ ثانیه فراصوت‌دهی و تیمار NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۵ ثانیه فراصوت‌دهی به دست آمد که از لحاظ آماری با تیمارهای NAA $mg\ l^{-1}$ ۰ + ۵ ثانیه، NAA $mg\ l^{-1}$ ۰/۱ + ۵ ثانیه، NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۰ ثانیه، NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۲۰ ثانیه و NAA $mg\ l^{-1}$ ۱ + ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی اختلاف معنی‌داری نداشتند. به نظر می‌رسد، در همهٔ

Archive of SID

www.SID.ir

سطوح NAA با ۵ ثانیه فراصوت‌دهی ریزنمونه‌ها، شمار سوخک‌های ریشه‌دار افزایش‌یافته است که این می‌تواند ناشی از افزایش شمار سوخک‌های به‌دست‌آمده باشد. با توجه به جدول مقایسهٔ میانگین داده‌ها بیشترین طول ریشه از ترکیب‌های تیماری mg l^{-1} NAA ۰ + ۵ ثانیه، ۰/۰۱+ mg l^{-1} NAA ۰ ثانیه، ۰/۰۱ mg l^{-1} NAA ۵ + ثانیه، ۰/۱ mg l^{-1} NAA ۵ ثانیه، ۱ mg l^{-1} NAA ۰ + ثانیه، ۱ mg l^{-1} NAA ۵ + ثانیه، ۱ mg l^{-1} NAA ۳۰ + ثانیه فراصوت‌دهی و تیمار شاهد مشاهده شد که بیشترین طول ریشه را تیمار ۱ mg l^{-1} NAA ۰ + ثانیه فراصوت‌دهی داشت. بر پایهٔ مقایسهٔ میانگین داده‌ها کمترین شمار ریشه، شمار سوخک‌های ریشه‌دار، میانگین شمار ریشه در هر سوخک و طول ریشه نیز در ترکیب تیماری ۰/۱ mg l^{-1} NAA + ۳۰ ثانیه فراصوت‌دهی بود (جدول۲). Bina & Zamani (2009) در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند، امواج فراصوت همراه با کاربرد هورمون اکسین، بر سرعت ریشه‌زایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین شمار و طول ریشه‌های قلمه‌های گل محمدی تأثیر زیادی داشت و باعث کاهش زمان ریشه‌زایی و افزایش درصد ریشه‌زایی شده بود. همچنین در گزارشی، فراصوت‌دهی ریشه‌های موئین گیاه *Echinacea purpurea* L. به مدت شش دقیقه و به‌صورت دوره‌ای، ضمن افزایش ساخت IAA درون‌زا، رشد ریشه‌ها را بهبود بخشیده بود (Liu *et al.*, 2012). با توجه به اینکه امواج فراصوت در این آزمایش تأثیر مثبتی بر ریشه‌زایی نداشت، دلیل این مغایرت نتایج با گزارش‌های یادشده، ممکن است تفاوت در نوع گیاه، نوع اندام تیمارشده و یا شدت و مدت فراصوت به‌کار رفته باشد، چراکه این عامل‌ها می‌توانند در تأثیر تیمار فراصوت دخیل باشند.

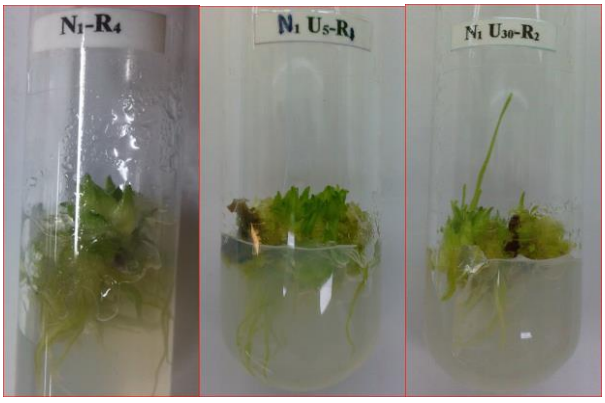
جدول ۲. مقایسهٔ میانگین ترکیب‌های تیماری NAA و فراصوت بر ریشه‌زایی در ریزنمونهٔ فلس

Table 2. Comparison of mean of NAA and ultrasound treatment combinations effects on root induction in scale explant

NAA concentration (mg l^{-1})	Duration ultrasound (s)	Number of roots	Number of rooted bulbs	Average number of root per bulb	Average length of roots (mm)
0	0	11.25^{cd}	2.97^{bc}	4^{bcd}	14.25^{abcd}
	5	10.67^{cd}	1.37^{c}	7^{abcd}	12.33^{abcde}
0.01	0	13.5^{bcd}	3.17^{b}	4.5^{bcd}	16^{abc}
	5	22.25^{bc}	1.55^{bc}	14.5^{a}	12^{abcdef}
0.1	0	15.5^{bcd}	1.42^{c}	2.5^{cd}	6.25^{efg}
	5	11.5^{cd}	1.67^{bc}	6.5^{abcd}	11.75^{abcdef}
	10	8^{cd}	1.66^{bc}	6.7^{bcd}	7.66^{cdefg}
	20	11.25^{cd}	1.67^{bc}	5^{bcd}	5.75^{fg}
	30	2^{d}	1.5^{c}	1^{d}	3^{g}
1	0	47.5^{a}	5.27^{a}	7.75^{abc}	18.75^{a}
	5	34.75^{ab}	2.27^{bc}	14.25^{a}	12.25^{abcdef}
	10	10^{cd}	2.8^{bc}	4.25^{bcd}	9.25^{bcdef}
	20	13^{cd}	1.87^{bc}	6.75^{abcd}	7.25^{defg}
	30	31.33^{ab}	2.87^{bc}	11^{ab}	16.66^{ab}

میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

Means with same letters are not significantly different at $p< 0.05$.



شکل ۱. بیشترین شمار ریشه‌ها

Figure 1. Maximum number of the roots

Archive of SID

www.SID.ir

در آزمایش سوم، غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد BA (در چهار سطح ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و زمان‌های مختلف قرارگیری در معرض امواج فراصوت (در پنج سطح ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ثانیه) برای ریشه‌زایی و پینه‌زایی ریزنمونهٔ فلس بررسی شد. در این آزمایش، به دلیل تأثیر امواج فراصوت، پس از مدتی شماری از ریزنمونه‌های فلس از بین رفت که این تیمارها در تجزیهٔ داده‌ها حذف شد. در کناره‌های برخی از فلس‌های آسیب‌دیده توده‌های پینه مانندی تولیدشده بود که همانند به فلس‌های بسیار ریز در حد میلی‌متر بودند که رشدنیافته بودند. همچنین فلس‌های فراصوت داده شده که در محیط کشت MS حاوی $mg\ l^{-1}$ BA ۱ کشت شده بودند، سوخک‌هایی تولید کردند که به‌ندرت فلس‌های آن‌ها تمایزیافته بودند. بنابراین داده‌ها به‌صورت ترکیب تیماری در قالب طرح کامل تصادفی تجزیهٔ آماری شد. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر ترکیب‌های تیماری بر صفات شمار ریشه‌ها، شمار ریشه در هر سوخک و شمار سوخک‌های ریشه‌دارشده در سطح احتمال ۱ درصد و بر میانگین طول ریشه‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. بر پایهٔ تجزیهٔ واریانس داده‌ها، اثر ترکیب‌های مختلف BA و فراصوت بر وزن تر پینه معنی‌دار نبود (داده‌ها نشان داده نشدند).

مقایسهٔ میانگین داده‌ها برای اثر متقابل تیمارهای BA و امواج فراصوت نشان داد، بیشترین شمار ریشه‌های به‌دست‌آمده از تیمار شاهد و ترکیب‌های تیماری $mg\ l^{-1}$ BA ۰ + ۰ ۵ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰ + ۰/۰۱ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۵ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۱ + ۵ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۱ + ۳۰ ثانیه فراصوت به دست آمد که از میان آن‌ها ترکیب $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۵ ثانیه بیشترین شمار ریشه را داشت. با اینکه در غلظت ۰ و $mg\ l^{-1}$ BA ۱، فراصوت تأثیر مثبتی در ریشه‌زایی نداشت، اما در غلظت پایین BA شمار ریشه‌های به‌دست‌آمده را افزایش داد. بر پایهٔ جدول مقایسهٔ میانگین داده‌ها تیمار شاهد و ترکیب‌های تیماری $mg\ l^{-1}$ BA ۰ + ۵ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۰ ثانیه و $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۵ ثانیه بیشترین شمار ریشه در هر سوخک را به خود اختصاص دادند. همچنین بیشترین شمار سوخک‌های ریشه‌دارشده از تیمار $mg\ l^{-1}$ BA ۰ + ۵ ثانیه فراصوت به دست آمد که با تیمارهای شاهد، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۰ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۵ ثانیه و $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۱ + ۵ ثانیه فراصوت‌دهی اختلاف معنی‌داری نداشت. تیمار شاهد نیز با داشتن بلندترین میانگین طول ریشه اختلاف معنی‌داری با تیمارهای $mg\ l^{-1}$ BA ۰ + ۵ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۰ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ + ۵ ثانیه، $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۱ + ۵ ثانیه و $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۱ + ۳۰ ثانیه فراصوت نداشت (جدول ۳). غلظت بیشتر از $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۰۱ تأثیر بازدارندگی بر ریشه‌زایی داشت و ریشه‌های ناشی از تیمارهای $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۱ + ۵ ثانیه و $mg\ l^{-1}$ BA ۰/۱ + ۳۰ ثانیه فراصوت نیز بیشتر از پینه منشأ گرفته بود. به‌طورکلی در این آزمایش تیمار شاهد برای ریشه‌زایی مناسب‌تر بود.

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین ترکیب‌های تیماری BA و فراصوت بر ریشه‌زایی در ریزنمونهٔ فلس

Table 3. Comparison of mean of BA and ultrasound treatment combinations effects on root induction in scale explant

BA concentration ($mg\ l^{-1}$)	Duration ultrasound (s)	Number of roots	Number of rooted bulbs	Average number of root per bulb	Average length of roots (mm)
0	0	11.25^{a}	2.97^{a}	4^{ab}	14.25^{a}
	5	10.67^{a}	1.36^{abc}	7.33^{a}	12.36^{ab}
0.01	0	6.75^{ab}	1.75^{ab}	4.25^{ab}	7.25^{abc}
	5	12^{a}	1.55^{abc}	3.25^{ab}	9.25^{abc}
0.1	0	0^{b}	0^{c}	0^{b}	0^{c}
	5	10^{ab}	0.7^{bc}	4.67^{ab}	7^{abc}
	30	10.25^{ab}	0^{c}	0^{b}	12^{abc}
1	0	0^{b}	0^{c}	0^{b}	0^{c}
	10	0.25^{b}	0^{cd}	0^{b}	3^{bc}
	20	0.67^{b}	0.67^{bc}	0.33^{b}	1.33^{c}
	30	0^{b}	0^{c}	0^{b}	0^{c}

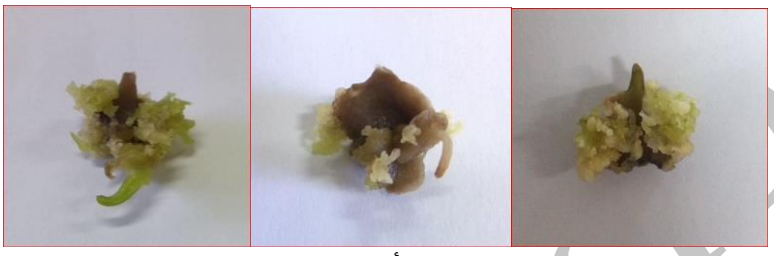
میانگین‌های دارای حرف‌های مشترک از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

Means with same letters are not significantly different at $p< 0.05$.

Archive of SID

www.SID.ir

در آزمایش چهارم، بهترین ترکیب‌های هورمونی NAA و BA که از آزمایش اول برای ریشه‌زایی نتیجه گرفته شده بود، همراه با زمان‌های مختلف قرارگیری در معرض امواج فراصوت با استفاده از ریزنمونهٔ فلس بررسی شد. مشاهده‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد، شماری از ریزنمونه‌های فلس که در معرض امواج فراصوت قرار داده شدند، پس از ده روز از بین رفتند. در کناره‌های فلس‌های آسیب‌دیده توده‌های پینه مانندی تولیدشده بود که همانند به فلس‌های بسیار ریز در حد میلی‌متر بودند که رشدنیافته بودند (شکل ۲). شماری از ریزنمونه‌های فلس نیز سالم مانده و به‌طور طبیعی باززایی شدند. در این آزمایش به دلیل ناکافی بودن شمار تکرارهایی که فلس‌های رشد یافته داشتند، تجزیهٔ داده‌ها انجام نشد.



شکل ۲. فلس‌هایی که تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفته‌اند.

Figure 2. Scales that are affected by ultrasound waves.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج گزارش‌های به‌دست‌آمده نشان داده‌اند، فراصوت می‌تواند تأثیر متفاوتی بر بافت‌های مختلف داشته باشد. در این تحقیق، امواج فراصوت موجب ایجاد آسیب در برخی از ریزنمونه‌های فلس شد و ریشه‌زایی را تحریک نکرد. BA نیز تأثیر بازدارنده در این زمینه داشت. برای ریزازدیادی سوسن چلچراغ با استفاده از ریزنمونه‌های فلس، تیمار NAA $1\ mg\ l^{-1}$ برای تولید گیاهچه‌هایی با شبکهٔ ریشه‌ای قوی مؤثر بود. تنظیم‌کننده‌های رشد و امواج فراصوت نیز تأثیر معنی‌داری بر میزان پینه‌زایی ریزنمونه نداشتند.

REFERENCES

1. Ananthakrishnan, G., Xia, X., Amutha, S., Singer, S., Muruganantham, M., Yablonsky, S., Fischer, E. & Gaba, V. (2007). Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants *in-vitro*. *Plant Cell Reports*, 26, 267-276.
2. Azadi, P. & Khosh-Khui, M. (2007). Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4, 582-591.
3. Azadi, P. & Mojtahedi, N. (2010). Effect of growth regulators sucrose concentration and scale segment on micropropagation of *Lilium ledebourii* in winter harvested bulbs. *Pazhohesh and Sazandeghi in Agronomy and Horticulture*, 81, 154159. (in Farsi)
4. Bageri, A. & Saffari, M. (2007). *Principles of plant tissue culture*. Mashhad: publications of Mashhad Ferdowsi University. (in Farsi)
5. Bina, F. & Zamani, Z. (2009). Investigation of the effect of ultrasound and various concentration of auxin (IBA) on rooting rose (*Rosa damascena* Mill.) cuttings. In: Proceedings of *6th Congress of Iran Horticultural Science*, Gilan University, pp .1059-1061. (in Farsi)
6. Bochu, W., Jiping, S., Biao, L., Jie, L. & Chuanren, D. (2004). Soundwave stimulation triggers the content change of the endogenous hormone of the Chrysanthemum mature callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37, 107-112.
7. Chang, C., Chen, C. T., Tsai, Y. C. & Chang, W. C. (2000). A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. Var. Gloriosoides Baker. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 41, 139-142.
8. El-Naggar, H., Osman, A. & Sewedan, E. (2012). *In-vitro* propagation and organogenesis of Lilium 'Prato'. *African Journal of Biotechnology*, 82, 14771-14776.
9. Farsam, H., Amanlou, M., Amin, G., Nezamivand- Chegini, G., Salehi- Surmaghi, M. H. & Shafiee, A. (2003). Anatomical and phytochemical study of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss; a rare endemic spesies in Iran. *DARU Journal*, 4, 164-170.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Gaba, V., Kathiravan, K., Amutha, S., Singer, S., Xiaodi, X. & Ananthakrishnan, G. (2006). The uses of ultrasound in plant tissue culture. *Plant Tissue Culture Engineering*, 417-426.
11. Izadi, N., Mashayekhi, K., Chamani, E., Kamkar, B. (2001). The influence of B5 basal medium on morphological behavior of Lily (*Lilium longiflorum*) bulbscale *in-vitro*. *Plant Production*, 18(1), 119- 132. (in Farsi)
12. Kanchanapoom, K., Ponpiboon, T., Wirakiat, W. & Kanchanapoom, K. (2011). Regeneration of lily (*Lilium longiflorum* 'Easter lily') by callus derived from leaf explants cultured *in-vitro*. *Science Asia*, 37, 373-376.
13. Kapoor, R., Kumar, S. & Kanwar, J. K. (2009). Bulblet production from node explant grown *in-vitro* in hybrid lilies. *International Journal of Plant Production*, 3, 1-6.
14. Khavar, K. M., Cocu, S., Parmaksiz, I., Sarihan, E. O. & Ozcan, S. (2005). Mass proliferation of Madonna Lily (*Lilium candidum* L.) under *in-vitro* coditions. *Pakistan Journal Botany*, 2, 243-248.
15. Lamberova, M. E., Khmeleva, A. N., Emelianova, I. S., Lamberova, A. A. & Kosolapova, A. S. (2006). Researching of ultrasonic influence to sterilization and plants cells growth of culture *in-vitro*. *Electron Devices and Materials*, 294-296.
16. Liu, R., Li, W., Sun, L. Y. & Liu, C. Z. (2012). Improving root growth and cichoric acid derivatives production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* by ultrasound treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 62-66.
17. Liu, Y., Takatsuki, H., Yoshikoshi, A., Wang, B. & Sakanishi, A. (2003a). Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H^+-ATPase activity of *Aloe arborescens* callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32, 105-116.
18. Liu, Y., Yoshikoshi, A., Wang, B. & Sakanishi, A. (2003b). Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nipponbare callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27, 287-293.
19. Marinangeli, P. A., Hernandez, L. F., Pellegrini, C. P. & Curvetto, N. R. (2003). Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 3, 324-329.
20. Memar Moshrefi, M, Moini, A. & Tavasolian, I. (2002). Effects of plant growth regulators NAA, BAP. Different explants scale photoperiod on tissue culture of *Lilium ledebourii* Boiss. *Journal of Iran Crop Sciences*, 4(4), 261-253. (in Farsi)
21. Miller, D. L. (1983). The botanical effects of ultrasound: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 1, 1- 27.
22. Mir, J. I., Ahmed, N., Itoo, H., Sheikh, M. A., Rashid, R. & Wani, S. H. (2012). *In-vitro* propagation of Lilium (*Lilium longiflorum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 82, 455-558.
23. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Journal of Plant Physiology*, 15, 473-497.
24. Naseri, M. T. & Ebrahimi Garvi, M. (1998). *Physiology bulbous flowers*. Mashhad: publications of Mashhad Ferdowsi University. (in Farsi)
25. Nhut, D. T. (1998). Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in-vitro* stem node and pseudobulblet culture. *Plant Cell Reports*, 17, 913-916.
26. Padasht Dahkaei, M. N., Khalighi, A., Naderi, R. & Mousavi, A. (2008). Effect of different concentrations of benzyladenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA) on regeneraton of *Lilium ledebourii* (Chelcheragh Lily) using bulblets microscales. *Seed and Plant Improvement Journal*, 24(2), 321-331. (in Farsi)
27. Robert Ault, J. & Siqueira, S. S. (2008). Morphogenetic response of *Lilium michiganense* to four auxin type plant growth regulators *in-vitro*. *Horticultural Science*, 43, 1922-1924.
28. Saifulah, K., Sheeba, N., Mariam, R., Naheed, K., Asma, N. & Bushra, S. (2010). Cultivation of lilies (*Lilium regale*) for commercialization in Pakistan. *Pakistan Journal Botany*, 42, 1103-1113.
29. Tang, Y. P., Liu, X. Q., Wahiti Gituru, R. & Chen, L. Q. (2010). Callus induction and plant regeneration from *in-vitro* cultured leaves, petioles and scales of *Lilium leucanthum* (Baker) Baker. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 24, 2071-2076.
30. Tatari Varnusfaderani, M., Fotouhi Ghazvini, R., Hamidoghli, Y. & Hatamzadeh, A. (2007). Effects of plant growth regulators and kind of explant on *in-vitro* culture of scales of Chelcheragh lily (*Lilium ledebourii* Bioss.). *Journal of Iran Agricultural Science*, 38(2), 276-284. (in Farsi)
31. Teixeira da Silva, J. A., Tran Thanh Van, K., Biondi, S., Nhut, D. T. & Maddalena Altamura, M. (2007). Thin cell layers: developmental building blocks in ornamental biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1, 1-13.
32. Torang, A. & Magsodi, M. (2012). Optimize medium for *in-vitro* callus production and regeneration of lily plantlets (*Lilium spp*.). *The first National Conference Biotechnology*, Gorgan, Golestan University, http://www.civilica.com/Paper-NSCBIO01-NSCBIO01_152.html. (in Farsi)
33. Wawrosch, C., Malla, P. R. & Kopp, B. (2001). Clonal propagation of *Lilium nepalense* D. Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Reports*, 20, 285-288.

Archive of SID

www.SID.ir