Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 49, No 4, Winter 2019 (891-901)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.230135.1219

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص ۹۰۱-۸۹۱)

معرفی یک پروتکل کشت بافت برای گیاه لاله واژگون (*Fritillaria raddeana*) با استفاده از ریزنمونه‌های بذر و سوخ

سلاله صلاحی‌صدر[۱]، هدایت زکی‌زاده[۲*]، محمدرضا نقوی[۳]، جمالعلی الفتی[۲] و کیان حضرتی[٤]

۱، ۲ و ٤. دانشجوی دکتری مهندسی علوم باغبانی (گیاهان زینتی) و استادیار، دانشکده علوم کشاورزی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت

۳. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

٤. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، بانک گیاهی، مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۱/۱٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۸/۲۰)

چکیده

لاله واژگون گرگانی (*Fritillaria raddeana* Regel.) از گیاهان پیازی خانواده سوسن و یکی از زیباترین گیاهان دنیا است. این گونه بومی ایران، ترکمنستان، به‌طور معدود پاکستان و افغانستان می‌باشد. دارای ارزش زینتی- دارویی و تحمل نسبی به خشکی و مناطق سنگلاخی و شیب‌دار می‌باشد. به‌منظور معرفی و اهلی‌سازی این گیاه بومی، خودرو و در معرض خطر انقراض، نخستین قدم، بررسی روش‌های مختلف تکثیر از جمله ریزازدیادی آن است. این پژوهش یک سیستم کارآمد برای باززایی غیرمستقیم از کشت بذر و سوخ، در محیط درون شیشه‌ای ارائه می‌دهد. اندام‌های گیاه پس از برداشت از گیاه یا استخراج سوخ از خاک در طبیعت، ضدعفونی‌شده و به‌عنوان ریزنمونه استفاده شدند و تأثیر غلظت‌های مختلف سایتوکینین (کایتین، تیدیازورون، بنزیل‌آدنین) و اکسین (ایندول‌استیک‌اسید، ایندول‌بوتیریک‌اسید، نفتالین‌استیک‌اسید) بر پینه‌زایی و باززایی مورد ارزیابی قرار گرفت. تلفات کمتر، آلودگی بسیار پایین و درصد پینه‌زایی بالاتر از مزایای ریزنمونه بذر و وزن پینه بیشتر و درصد باززایی بالاتر در بازه زمانی یکسان، از امتیازات ریزنمونه فلس سوخ تشخیص داده شد. همچنین اکثر این ریزنمونه‌ها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک-اسید همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون در مسیر باززایی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: باززایی غیرمستقیم، تنظیم‌کننده رشد، پینه‌زایی، گونه بومی.

Introducing a tissue culture protocol for Fritillaria (*Fritillaria raddeana*) via seed and bulb scales

Solaleh Salahi Sadr[1], Hedayat Zakizadeh[2*], Mohammad Reza Naghavi[3], Jamalali Olfati[2] and Kian Hazrati[4]
1, 2. Ph. D. Student and Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. M.Sc., Plant GeneBank, Iranian Biological Resource Centre (IBRC), ACECR, Tehran, Iran
(Received: Apr. 3, 2017 - Accepted: Nov. 11, 2017)

ABSTRACT

Fritillaria raddeana is one of the most fascinating flowers, belonging to Lilliaceae family, native to Iran, Turkmenistan, rarely found in Afghanistan and Pakistan. It is an important ornamental-medical bulbous plant, tolerant to arid conditions and stony slopes but facing extinction, so *in vitro* propagation of this plant will have a great importance for introduction and domestication of this wild and endangered plant. The present study was carried out to find an efficient system for *in vitro* callus induction and regeneration of *F. raddeana* via culturing of seeds and bulb scales. These explants were sterilized first and then cultured on media containing various concentrations of plant growth regulators. Different proportions of Auxins (6- indole-3-acetic acid (IAA), α-Naphthaleneacetic acid (NAA), Indole-3-butyric acid (IBA), Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)) and Cytokinins (Benzylaminopurine (BAP), Thidiazuron (TDZ), Kinetin (KIN)), and different MS basal media were tested. More survival percentage, less contamination and higher percentage of callus formation were the advantages of seed explants and heavier callus with higher regeneration percentage during the same period of time were the positive points of bulb scales explants. The best callus formation and regeneration medium was MS medium supplemented with 2 mgl^{-1} TDZ + 0.5 mgl^{-1} IBA.

Keywords: Callus formation, endemic plant, indirect regeneration, plant growth regulators.

* Corresponding author E-mail: Zakizadeh@guilan.ac.ir; Zakizadeh55@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لاله واژگون (*Fritillaria* spp.)، از گیاهان با ارزش زینتی و دارویی خانواده سوسن (Liliaceae) در راسته سوسن (Liliales) و زیرگروه تک‌لپه‌ای‌ها است (Ghahreman & Attar, 1999). گیاه لاله واژگون گونه رادیانا (*Fritillaria raddeana* Regel) که در فارسی به نام لاله واژگون زرد یا لاله گرگانی شناخته می‌شود از گیاهان سوخ‌دار این تیره است و یکی از ۱۷ گونه لاله واژگون شناسایی شده در ایران است (Rechinger, 1990) که در گرگان و خراسان شمالی و به‌ندرت در مازندران و منطقه غرب کشور یافت می‌شود. گونه *F. raddeana* به‌همراه *F. imperialis* در زیرجنس Petilium قرار داشته؛ رنگ آن زرد لیمویی و یا زرد کمرنگ و دارای ارتفاعی در حدود ۵۰ تا ۸۰ سانتی‌متر (Rix, 1977; Rechinger, 1990; Kamari, 1996)، بومی مناطق سرد و خشک و سنگلاخی است (Mirdeilami *et al*., 2012) و فاقد بوی نامطبوعی است که در اکثر گونه‌های این جنس وجود دارد (Helsper *et al*., 2006). ازدیاد در این گونه از طریق سوخ و بذر است. سوخ دارای یک تا پنج فلس آبدار، کامل یا نیمه رشد کرده بوده و قطر آن در حدود پنج تا ۱۰ سانتی‌متر است (Baranova, 1981). گل‌ها منظم و روی گل‌آذین چتری قرار دارند؛ میوه آن کپسول و دارای تعداد زیادی بذر می‌باشد (Ghahreman & Attar, 1999). سرعت تکثیر طبیعی این گونه بسیار پایین است و به‌دلیل تعداد کم فلس، سلول‌های مریستمی بسیار کم می‌باشند و در نتیجه، درصد بازده ازدیاد با روش‌های سنتی فلس‌برداری یا تقسیم سوخ نیز بسیار کم است (Bryan, 2002; Le Nard & De Hertogh, 1993). گونه *F. raddeana* از طریق بذر نیز تکثیر می‌شود، اما حتی در شرایط مناسب نیز تا زمان ایجاد یک سوخ گلده، در حدود پنج تا هفت سال زمان مورد نیاز است (Le Nard & De Hertogh, 1993). هم‌چنین بذور در زمان پراکنش دارای جنین تکامل‌نیافته بوده و دارای خواب عمیق پیچیده‌ی مورفوفیزیولوژیک هستند (Baskin & Baskin, 2014) و به‌دلیل دگرگرده‌افشانی گیاهان حاصل دارای تفرق صفات خواهند بود (Le Nard & De Hertogh, 1993).

علی‌رغم ارزش زیبایی‌شناختی این گونه و خاصیت دارویی سوخ آن که دارای مواد ضد درد است (Li *et al*., 2001)، تاکنون به ندرت از آن به‌عنوان یک گیاه زینتی و یا یک گیاه دارویی استفاده شده است. با توجه به خطر انقراض گونه‌های لاله واژگون و بومی بودن این گونه، هر گونه تحقیقی در زمینه کشت و تولید این گیاه، به‌جهت مدیریت منابع ژنتیکی و حفاظت از این ذخایر ارزشمند، ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین ازدیاد درون شیشه‌ای گیاهانی مانند *F. raddeana* که دارای محدودیت ازدیاد بوده و به‌دلیل چرای دام‌ها، برداشت گل و پیاز توسط گردشگران از طبیعت و انواع آلودگی درون‌زاد، از لحاظ اقلیم نیز دچار تهدید شده است، مزایای قابل‌توجهی را داراست (Bajaj *et al*., 1988; Fay, 1992; Sudha & Seeni, 1994; Gharehyazie *et al*., 2004).

علی‌رغم اهمیت *F. raddeana*، تا به امروز هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر آزمایش‌های درون‌شیشه‌ای در این گونه دیده نشده است. در پژوهش حاضر، به‌عنوان نخستین آزمایش ثبت‌شده در این گونه، ریزنمونه‌های بذر و سوخ در محیط‌های کشت با ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند تا پروتکلی جهت حفظ و ازدیاد درون شیشه‌ای این گونه بومی و انحصاری، با استفاده از سوخ و بذر نوشته شده و مقدماتی جهت بررسی‌های تکمیلی فراهم شود تا در مرحله نخست، این گونه با ارزش بومی از خطر انقراض نجات یابد و در مراحل بعد، از این نتایج در زمینه‌های دارویی، زینتی و فضای‌سبز شهری بهره‌برداری شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آماده‌سازی ریزنمونه‌ها

ریزنمونه فلس سوخ

سوخ‌های *F. raddeana* از رویشگاه‌های طبیعی در استان خراسان شمالی (تپه‌های سنگلاخی شاهرود به سمت آزادشهر) جمع‌آوری و پس از شستشوی سطحی با آب و مایع شوینده و تیمار با قارچکش (کاربندازیم ۰/۵٪+ بنومیل ۰/۵٪، یک ساعت)، به‌مدت ۴۸ ساعت هواخشک گردید. سپس درون پاکت کاغذی به‌مدت

www.SID.ir

Archive of SID

چهار تا هشت هفته در دمای ۴ °C برای غلبه بر رکود نگه‌داری شدند (Petrić *et al*., 2013).

پس از گذراندن دوره سرمایی، در هر بار کشت، کل سوخ با قارچ‌کش (کاربندازیم ٪۲ + بنومیل ٪۲، یک ساعت) تیمار و با تیغ اسکالپل استریل به چهار قسمت تقسیم شد و درون نیم لیتر آب دارای دو قطره توین ۲۰ به‌مدت پنج دقیقه روی شیکر تکان داده شد و پس از آن، به‌مدت یک ساعت در زیر آب جاری قرار گرفت. سپس به‌مدت ۶۰ ثانیه در الکل ٪۷۰ غوطه‌ور شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها در محلول دارای ٪۲ سدیم‌هیپوکلریت (ضدعفونی‌کننده با نام تجاری دامستوس) به‌مدت ۱۵ دقیقه درون شیشه و در محفظه مخصوص دستگاه پمپ هوا قرار گرفت تا حباب‌های هوا خارج شده و مواد ضدعفونی‌کننده به سطوح دور از دسترس، در لابه‌لای فلس نمونه‌ها نفوذ کند. در پایان ریزنمونه‌های استریل‌شده در زیر هود لامینار با آب مقطر دو بار تقطیر استریل، سه بار و با فاصله زمانی ۵ دقیقه آبکشی شدند. قطعات فلس به اندازه‌های ۰/۵×۱×۱ سانتی‌متر مربع تقسیم (به شکل مکعب مستطیل) و در محیط کشت‌های پایه موراشیگی و اسکوگ (MS)، (Murashige & Skoog, 1962) دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و شامل تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین، ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA)، نفتالن‌استیک‌اسید (NAA) و ۲، ۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) و سایتوکینین‌های بنزیل آدنین (BA)، کاینتین (KIN) و تیدیازورون (TDZ) هرکدام در غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و ترکیب یک نوع اکسین با یک نوع سایتوکینین کشت شد. پیش از اتوکلاو کردن محیط‌های کشت در °C ۱۲۱، اسیدیته روی ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم و محیط با دو و نیم میلی‌گرم در لیتر فیتاژل (Duchefa, The Netherland) جامد شد. دور درب ظروف (شیشه مربا) برای جلوگیری از نفوذ آلودگی خارجی و پراکنش اسپور قارچ در آلودگی داخلی، ابتدا با پارافیلم و سپس با سلفون پوشیده شد و در تاریکی و دمای ۲±°C ۱۸ قرار داده شدند. پس از القای پینه و تورم آن، ظروف کشت به محیطی با شدت نور $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot S^{-1}$ ۲۰ و دمای ۲±°C ۱۸ انتقال یافتند. در مرحله بعد پینه‌های بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم انتخاب و به محیط‌های باززایی شامل ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد IBA، NAA، 2,4-D، BA، KIN و TDZ در غلظت‌های مشابه با آزمایش پینه‌زایی (۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر) و در شدت نور $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ۲۰ و دمای ۲±°C ۲۰ منتقل شدند.

ریزنمونه بذر

در حدود دو ماه پس از پایان فصل گلدهی در طبیعت، مجددا برای برداشت بذر به رویشگاه‌های طبیعی مراجعه شد. از آنجا که جنین بذر گونه *F. raddeana* هنگام برداشت تکامل‌نیافته است برای برطرف‌نمودن این خواب طولانی‌مدت، بذور نیاز به سرمادهی مرطوب دارند. بذور درون کاغذ صافی مرطوب در پتری‌دیش قرار داده شد و به‌مدت چهار تا شش هفته در دمای ۴°C قرار داده شد. پس از طی این مدت، بذرها با آب جاری شستشو و در آب دارای دو قطره توین ۲۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس یک ساعت در زیر آب جاری قرار گرفته و ۶۰ ثانیه نیز در الکل ٪۷۰ ضدعفونی شدند. این بذور در مرحله بعد ۱۵ دقیقه با محلول ٪۲/۵ سدیم‌هیپوکلریت (ضدعفونی‌کننده با نام تجاری دامستوس) ضدعفونی و مانند نمونه‌های فلس در زیر لامینار آبکشی شدند. هنگام کشت به‌دلیل کوچک‌بودن جنین بذر و وجود بازدارنده‌های روی پوسته بذر، خراش‌دهی یا اسکاریفیکاسیون انجام شد؛ بذور به‌صورت مثلثی با تیغ اسکالپل استریل برش داده شد و قسمتی که جنین را شامل می‌شد، به‌صورت افقی روی محیط‌های رشد مختلف (محیط با پایه MS به تنهایی، محیط با پایه MS همراه با ٪۰/۱ زغال‌فعال و محیط B5 (Gamborg *et al*., 1968) قرار گرفتند. این محیط‌ها همگی دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، فاقد تنظیم‌کننده رشد و با پنج تکرار (پنج ریزنمونه در هر تکرار) بودند. پس از حدود چهار ماه جنین‌های رشد کرده از درون بذر خارج شده و در محیط‌های پینه‌زایی کشت شد. سایر مراحل آزمایش مشابه ریزنمونه فلس تکرار شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری داده‌ها و محاسبات آماری

شیشه‌های کشت محتوی ریزنمونه‌های فلس پس از عایق‌بندی با پارافیلم و سلفون به‌مدت ۱۵ روز در تاریکی و ۱۵ روز در روشنایی قرار داده شدند. پس از طی این دوره درصد بقای ریزنمونه‌ها با تقسیم تعداد ریزنمونه‌های زنده به تعداد کل کشت‌شده ارزیابی شد؛ هم‌چنین درصد تشکیل پینه نیز حدود یک‌ماه پس از انتقال (۶۰ روز پس از کشت اولیه)، از تقسیم تعداد ریزنمونه‌های پینه‌داده به تعداد نمونه‌های زنده‌مانده به‌دست آمد. ۹۰ روز پس از کشت اولیه (واکشت هر سه هفته یک‌بار)، وزن تر پینه‌ها با ترازوی دقیق در زیر هود لامینار اندازه‌گیری شد. تقریباً دو ماه پس از انتقال به محیط باززایی، درصد باززایی با تقسیم ریزنمونه‌های باززایی‌شده بر ریزنمونه‌هایی که تشکیل پینه دادند به‌دست آمد. این بخش از پژوهش برای هر دو نوع ریزنمونه (فلس و بذر) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های انواع ترکیبات تنظیم‌کننده رشد، از بین هر ترکیب غلظت‌های با بیشترین بازده، انتخاب و آنالیز شد. این مرحله در قالب طرح اسپلیت‌پلات (کرت‌های خردشده) انجام گرفت و میانگین داده‌ها با آزمون توکی مقایسه شدند. در محاسبه‌های آماری برخی از محیط‌های کشت به‌دلیل عدم پاسخ‌دهی و یا پاسخ‌دهی بسیار ضعیف ریزنمونه‌ها به تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد، حذف گردیدند. برای تأیید نتایج به‌دست آمده آزمایش دو بار تکرار و از میانگین داده‌های حاصل از دو آزمایش برای آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج کشت ریزنمونه‌های بذری نشان داد که بهترین محیط کشت برای جوانه‌زنی، محیط کشت MS دارای زغال فعال با ۶۰٪ جوانه‌زنی بود (جدول ۱). همان‌گونه که بیان شد، بذر *F. raddeana* دارای رکود عمیق پیچیده مورفوفیزیولوژیک است (Baskin & Baskin, 2014). بر طبق منابع، تا زمان تکمیل پس‌رسی جنین بذر در جنس لاله واژگون، رشد جنین صورت نمی‌گیرد و رشد مورفولوژیک و فیزیولوژیک جنین در حالت عادی، نیازمند سپری‌شدن مدت زمانی طولانی است که در گونه‌های مختلف متفاوت است (Yaojia *et al*., 1992; Kizil & khawar, 2014)، در این آزمایش نیز می‌توان عدم جوانه‌زنی بذر را به عواملی از جمله رکود جنین و وجود بازدارنده‌های جوانه‌زنی نسبت داد (Zhiliang *et al*., 1989; Yu *et al*., 2008). افزودن زغال فعال به‌میزان ۱۰ گرم در لیتر باعث جذب متابولیت‌های سمی تولیدشده از بذر از جمله ترکیبات فنلی و بازدارنده و بهبود رشد جنین می‌شود (Thomas, 2008; Zhou *et al*., 2010)، هم‌چنین موجب جذب ترکیباتی می‌شود که در هنگام رشد و نمو سلول‌ها تولید می‌شود و از رشد جنین و ریشه‌زایی جلوگیری می‌کند (Fridborg *et al*., 1978). تنظیم‌کننده‌های بازدارنده رشد مانند آبسیزیک‌اسید و اتیلن که ممکن است در بذر موجود باشد و یا تولید شود نیز توسط زغال فعال جذب می‌گردد (Thomas, 2008; Kariyana & Nisyawati, 2013). زغال فعال باعث ایجاد تاریکی نسبی مشابه شرایط زیر خاک می‌شود (Thomas, 2008) و تحت این شرایط جوانه‌زنی بذر بهبود می‌یابد (YanLi *et al*., 2010).

جدول ۱. تأثیر نوع محیط کشت بر جوانه زنی بذور *Fritillaria raddeana*

Table 1. Effects of basal medium on seed germination of *Fritillaria raddeana*

Medium	Seed germination (%)*
MS + 0.1 % activated charcoal	60 [a]
MS	30 [b]
B5	6 [c]

* میانگین‌هایی که با حروف یکسان، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون توکی تفاوت معنی‌دار ندارند.

* Means with the same letters are not statistically different among treatments by the Tukey test ($p<0.05$).

به‌دلیل آلودگی داخلی باکتریایی و قارچی بسیار بالا در فلس‌های *F. raddeana* علی‌رغم استفاده از روش‌های مختلف ضدعفونی، تغییر برند شوینده دارای سدیم‌هیپوکلریت، مدت زمان تیمار و غلظت مواد ضدعفونی‌کننده، استفاده از انواع قارچکش، آنتی‌بیوتیک، تیمار آب گرم در بازه‌های زمانی مختلف و صرف زمان حدود شش ماه، غلبه بر آلودگی قارچی و باکتریایی با موفقیت چندانی همراه نبود. از بین ریزنمونه‌های برداشت‌شده از قسمت‌های مختلف سوخ،

www.SID.ir

Archive of SID

به‌جز قطعه‌های نزدیک به صفحه پایگاهی در فلس‌های داخلی (Proximal end)، سایر قطعه‌ها در سه هفته‌ی نخست کشت، به‌دلیل آلودگی از بین رفتند. میانگین بقای کل در این نوع ریزنمونه ۲/۹۴٪ بود و در بهترین محیط کشت در بررسی جداگانه ریزنمونه‌های سوخ (۰/۵ mg/L KIN و ۲mg/L 2,4-D) تنها ۱۶٪ از ریزنمونه‌ها زنده ماندند. این نتایج مشابه گزارش ارائه‌شده در مورد گونه *F. roylei* بود (Joshi *et al.*, 2007). در مراحل بعد و تا انتهای آزمایش نیز، درصد تلفات ریزنمونه‌های فلس به‌دلیل آلودگی داخلی بیشتر بود. در کل، این مطلب بیانگر این است که در ریزنمونه فلس، حتی در بهترین حالت، آلودگی به‌طور کامل ریشه‌کن نمی‌شود. آلودگی داخلی بسیار بالا در لاله‌های واژگون از موانع عدم موفقیت نسبی یا کامل در کشت بافت این جنس است و محققین معتقدند باید ریزنمونه‌های جایگزین مانند اندام‌های هوایی مورد استفاده قرارگیرد (Witomska & Lukaszewska, 1997; Mohammadi-Dehcheshmeh *et al.*, 2007; 2008; Gholami, 2007; Hamidoghli, 2011).

جدول تجزیه واریانس بیانگر اختلاف بسیار معنی‌داری از نظر نوع ریز نمونه، محیط کشت و اثرات متقابل آنها در مرحله پینه‌زایی و وزن تر آن (جدول۲) و باززایی (جدول ۳) بود. در این بین، ریزنمونه‌های بذر میانگین درصد پینه‌دهی بالاتری داشتند. این عدد برابر با ۳/۲۸٪ در مقابل ۱/۲۱٪ پینه‌زایی حاصل از فلس سوخ بود. میانگین وزن پینه در بین تمامی محیط‌های مورد مطالعه، علی‌رغم کوچک‌بودن جنین، در بذر بیشتر بود (۱/۴۵ میلی‌گرم در بذر و ۱/۱۶ میلی‌گرم در سوخ). در مورد باززایی تیمارهای بدون پاسخ حذف و برترین محیط‌های باقی‌مانده باهم مقایسه شد. میانگین درصد باززایی نیز در ریزنمونه‌های بذر بالاتر بود (۱/۱۷٪ در بذر و ۱/۱۱٪ در سوخ). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که درخصوص هر دو نوع ریزنمونه محیط کشت، محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA دارای بیشترین درصد پینه‌زایی (شکل ۱) بود. در مرحله اندازه‌گیری وزن تر پینه نیز بهترین محیط شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه بذر بود. بیشترین میانگین وزن پینه در سوخ از محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد (شکل ۲). در مرحله باززایی نیز بهترین محیط در هر دو ریزنمونه، مشابه محیط پینه‌زایی (۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) بود (شکل ۳).

جدول ۲. تجزیه واریانس پینه‌زایی و وزن تر پینه در ریزنمونه بذر و سوخ *Fritillaria raddeana*

Table 2. Variance analysis of callus formation and fresh growth weight of *Fritillaria raddeana* (seed and bulb scales explant)

S.O.V	df	M.S.	
		Callus formation (%)	Callus fresh weight (mg)
Explant	1	7.93**	0.14**
Main plot error	2	0.003^{ns}	0.002*
Medium	8	49.32**	0.73**
Explant × Medium	8	39.52**	0.73**
Residual error	34	0.03	0.67
C.V. (%)		8.02	1.82

*، ** و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.

*, **, ns: Significant at 5 and 1% of probability level, and non-significant, respectively.

جدول ۳. جدول تجزیه واریانس باززایی در ریزنمونه بذر و سوخ *Fritillaria raddeana*

Table 3. Variance analysis of regeneration in *Fritillaria raddeana* (seed bulb scales explant)

S.O.V	df	M.S.
		Regeneration (%)
Explant	1	0.001^{ns}
Main plot error	2	0.0003^{ns}
PGR treatments	3	0.41**
Explant × Medium	3	0.02**
Residual error	14	0.0005
C.V. (%)		1.98

*، ** و ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.

*, **, ns: Significant at 5 and 1% of probability level, and non-significant, respectively.

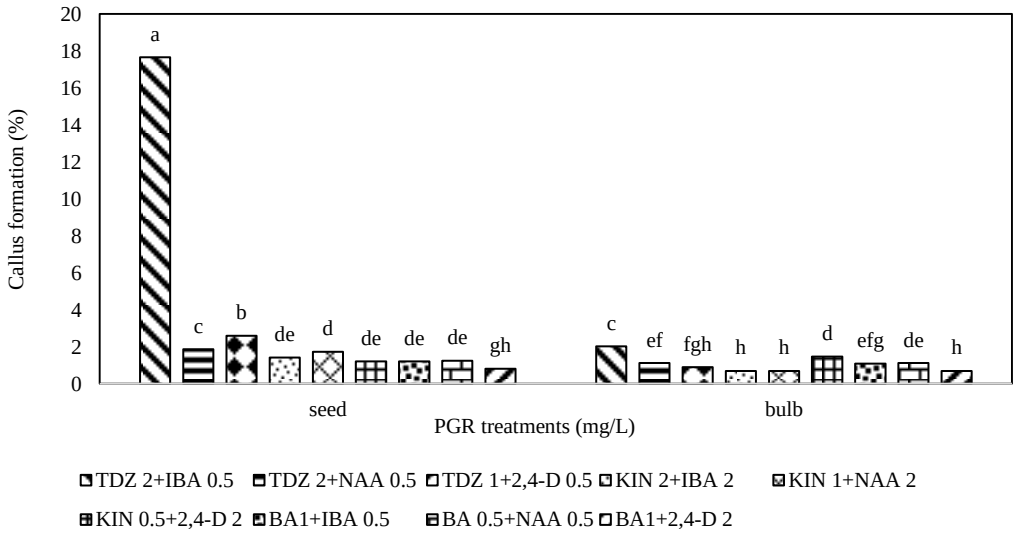
تحقیق‌ها نشان می‌دهد که در باززایی از جنین، تیمار سرمادهی در ۴°C، بیش از ترکیب تنظیم‌کننده‌های موجود در محیط کشت دارای اهمیت است (Carasso & Mucciarelli, 2014). در این آزمایش با توجه به نتایج تحقیق‌های ذکرشده بذور از ابتدا به‌مدت چهار تا شش هفته در دمای ۴°C قرار داده شدند. ریزنمونه‌های حاصل از بذر به‌دلیل عدم وجود آلودگی قارچی و باکتریایی شدید که در ژئوفیت‌ها به‌وفور دیده می‌شوند، ریزنمونه‌های بسیار مناسبی می‌باشند و توانایی پینه‌زایی و باززایی بالایی را دارا می‌باشند (Ziv & Lilien-kipins, 2000;

www.SID.ir

Archive of SID

Özcan *et al*., 2007). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که از جنین بالغ (Subotic *et al*., 2004) و نابالغ لاله واژگون (Özcan *et al*., 2007) در آزمایش‌های باززایی، سوخک‌های زیادی به‌دست آمده است. با این‌حال به‌دلیل کوچکی بذور، رکود طولانی‌مدت و کندرشد بودن جنین، از کشت بذر در محیط کشت تا پینه‌دهی و به‌دنبال آن باززایی، زمان زیادی صرف خواهد شد؛ در نتیجه وزن تر پینه در یک بازه زمانی مشخص، نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها کمتر است. در پژوهشی در رابطه با ریزازدیادی توده‌های ایرانی لاله واژگون، بیان شد که به‌دلیل زمان‌بر بودن تکثیر بذری لاله واژگون و نرخ ازدیاد پایین تولید سوخک، بهترین راه تکثیر، کشت بافت است، البته درصورتی‌که ریزنمونه‌ی مناسب بدون آلودگی داخلی انتخاب شود (Gholami, 2007).

ریزنمونه‌های شاهد در تمامی تیمارها، پیش از تشکیل پینه از بین رفتند؛ پس می‌توان گفت همانند بسیاری از آزمایش‌ها حضور تنظیم‌کننده‌های رشد برای بقای ریزنمونه‌ها در محیط رشد الزامی است (Aggarwal & Barna, 2004; Debiasi *et al*., 2007; Liao *et al*., 2004; Mohammadi-Dehcheshmeh *et al*., 2008; Palmer & Keller, 2011). در مقایسه انجام‌شده بین دو نوع ریزنمونه، همان‌گونه که ذکر شد، بالاترین میانگین تیمار پینه‌زایی از بذر و سوخ در محیط شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA دیده‌شد. این نتیجه در *F. pallidiflora* در محیط دارای KIN و 2,4-D دیده شد (Hao *et al*., 1982) که یکی از محیط‌های برتر پینه‌زایی از سوخ و بذر در این پژوهش بود. مشاهده و بررسی نتایج این پژوهش نشان‌دهنده نقش بسیار مهم سایتوکینین در مسیر فعال‌سازی و پینه‌زایی ریزنمونه‌های *F. raddeana* است. علی‌رغم این‌که در سایر تیمارهای آزمایش نیز تا حدودی پینه‌زایی دیده‌شد، اکثر این پینه‌ها از کیفیت و کمیت مناسبی برخوردار نبودند. شکل‌های ۴ و ۵ به‌ترتیب پینه‌های به‌دست‌آمده از سوخ و بذر *F. raddeana* را در محیط‌های کشت متفاوت نشان می‌دهد، تفاوت در شکل ظاهری این پینه‌ها به‌خوبی بیان‌کننده‌ی کیفیت پینه حتی پس از انتقال به محیط‌های باززایی می‌باشد. پینه‌های به‌دست‌آمده از محیط‌های دارای TDZ شاداب، شفاف، سبز براق و متراکم‌تر بودند (شکل ۵-c, e, f). گزارش‌هایی در تعدادی از گیاهان زینتی نیز وجود دارد که تأییدکننده نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش است، این آزمایش‌ها اثر TDZ بر ایجاد پینه‌های سبز، گره‌مانند و پر رشد را در ارقام شمعدانی، رز و کاسنی نشان می‌دهد (Murthy *et al*., 1998).



شکل ۱. تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر پینه‌زایی ریزنمونه در *Fritillaria raddeana*.

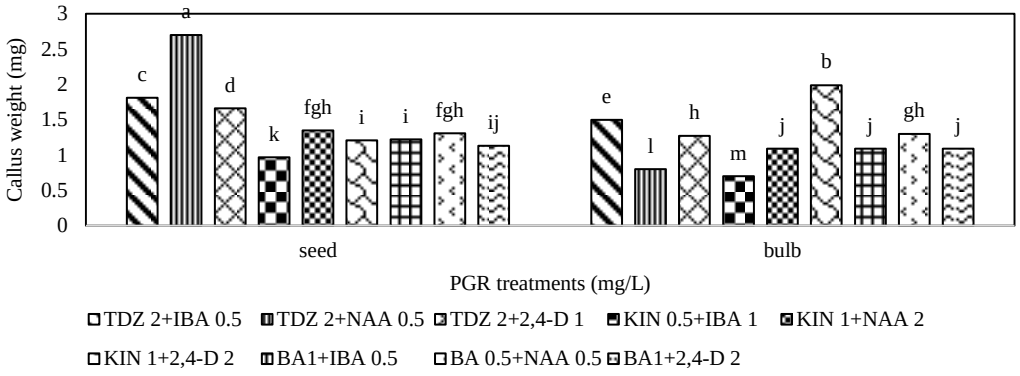
** میانگین‌هایی که با حروف یکسان دسته‌بندی شده‌اند در سطح احتمال ٪۵ از طریق آزمون توکی تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 1. Effect of plant growth regulators on callus formation of explants in *Fritillaria raddeana*

** Means with the same letters are not statistically different among treatments by the Tukey test ($p < 0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

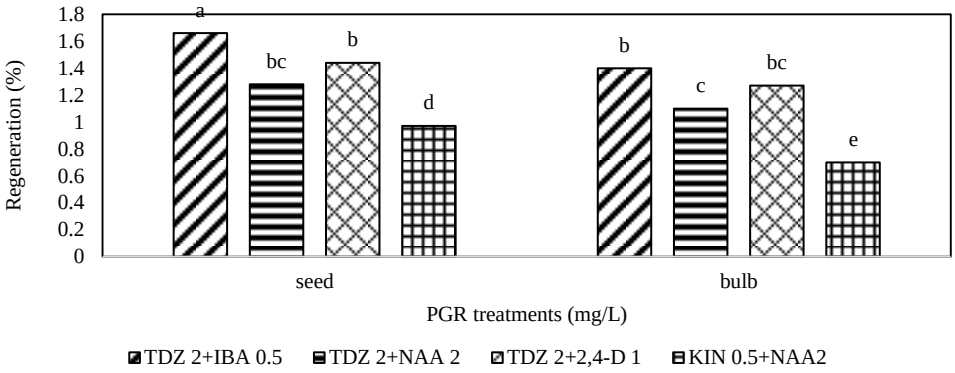


شکل ۲. تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر وزن تر پینه ریزنمونه در *Fritillaria raddeana*.

** میانگین‌هایی که با حروف یکسان دسته‌بندی شده‌اند در سطح احتمال ٪۵ از طریق آزمون توکی تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 2. Effect of plant growth regulators on callus fresh weight of explants in *Fritillaria raddeana*

** Means with the same letters are not statistically different among treatments by the Tukey test ($p < 0.05$).

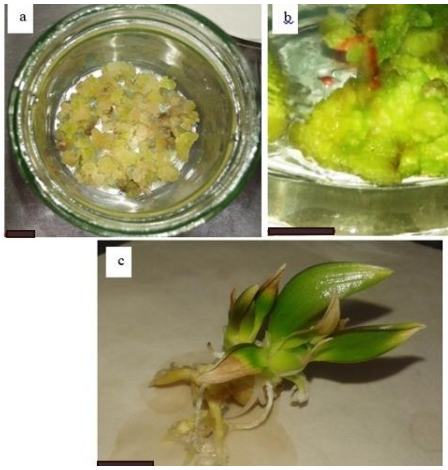


شکل ۳. تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر باززایی ریزنمونه در *Fritillaria raddeana*

** میانگین‌هایی که با حروف یکسان دسته‌بندی شده‌اند در سطح احتمال ٪۵ از طریق آزمون توکی تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 3. Effect of plant growth regulators on regeneration of explant in *Fritillaria raddeana*

** Means with the same letters are not statistically different among treatments by the Tukey test ($p < 0.05$).

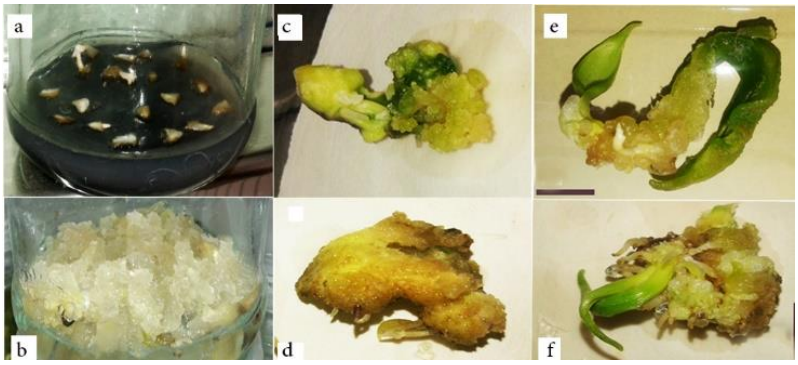


شکل ۴. تشکیل پینه و باززایی در فلس *Fritillaria raddeana* در محیط موراشیگی و اسکوگ (MS) (bar=1cm): a- پینه‌زایی در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین (KIN) و ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴- دی‌کلرو فنوکسی‌استیک‌اسید (2,4-D)، b- پینه‌زایی در محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA)، c- باززایی در محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA.

Figure 4. Callus formation and regeneration of *Fritillaria raddeana* via bulb scales: a- Callus formation on MS+ 0.5 mgl^{-1} KIN+ 2 mgl^{-1} 2,4-D; b- Callus formation of bulb scales, on MS medium containing 2 mgl^{-1} TDZ+0.5 mgl^{-1} IBA, c- Regeneration on MS medium containing 2 mgl^{-1} TDZ+0.5 mgl^{-1} IBA.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. تشکیل پینه و باززایی از جنین بذر *Fritillaria raddeana*: a- جوانه‌زنی بذر (bar=1cm) در محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS) همراه با ۰/۱ درصد زغال فعال (AC)، b- پینه‌زایی جنین پس از انتقال از محیط MS +AC به محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین (KIN) و ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴- دی‌کلرو فنوکسی‌استیک (2,4-D)، c- پس از انتقال به محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA)، d- پس از انتقال به محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، e- باززایی جنین ۲ ماه پس از انتقال به محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، f- باززایی جنین ۵ ماه پس از انتقال به محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA.

Figure 5. Callus formation and regeneration of *Fritillaria raddeana* from seeds embryo: a- Seed germination on MS medium+ 0.1% activated charcoal (AC); b- Callus formation on embryo, after transferring from MS+AC medium to MS+ 0.5 mgl^{-1} KIN+2 mgl^{-1} 2,4-D; c- After transferring to MS+ 2 mgl^{-1} TDZ+0.5 mgl^{-1} IBA; d- After transferring to MS+ 1 mgl^{-1} BA+0.5 mgl^{-1} IBA; e- Regeneration of seed embryo after 2 months, on MS medium containing 2 mgl^{-1} TDZ+0.5 mgl^{-1} IBA; f- Regeneration of seed embryo after 5 months, on MS medium containing 2 mgl^{-1} TDZ+0.5 mgl^{-1} IBA.

در بین تیمارهای مورد بررسی، هیچ‌گونه پینه‌زایی و باززایی در محیط‌های شاهد و یا در حضور یکی از تنظیم‌کننده‌های اکسین و سایتوکینین صورت نگرفت. هم‌چنین از بین سایتوکینین‌های مورد آزمایش، KIN و BA نسبت به TDZ پاسخ‌دهی بسیار کمی داشتند. در مطالعات باززایی از فلس *F. sonnikovae* نیز درصد باززایی بالایی در محیط دارای TDZ و NAA به‌دست آمد (Kulkhanova *et al*., 2015)، در آزمایشی روی ارقام سوسن نیز TDZ باعث شاخساره‌زایی در انواع ریزنمونه‌ها شده‌است (Li *et al*., 2000). بر خلاف مرحله پینه‌زایی در فلس، باززایی بسیار کمی در محیط دارای 2,4-D دیده شد؛ این نتایج مشابه نتایج پژوهش انجام‌شده روی علف چای (*Hypericum perforatum*) (Pretto & Santarem, 2000; Murch & Saxena, 2002; Palmer & Keller, 2010) و نوعی گون (*Astragalus cariensis*) (Erisen *et al*., 2010) بود. با این‌حال، زمانی‌که پینه‌های به‌دست‌آمده از محیط دارای 2,4-D به محیط باززایی محتوی غلظت‌های متفاوت برخی از انواع سایتوکینین به‌ویژه TDZ واکشت شدند، درصد باززایی بسیار بالاتری صورت گرفت؛ این نتایج با گزارش ثبت‌شده در علف چای تطابق دارد (Palmer & Keller, 2010). بر طبق آمار منتشرشده در بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۹، TDZ، پرکاربردترین ماده در باززایی سلول‌های گیاهی، در پژوهش‌های چاپ‌شده در مجلات ISI بوده است (Guo *et al*., 2011). بخشی از اثرات TDZ مرتبط با بیوسنتز پورین‌ها و ذخیره‌سازی آن‌هاست که به‌وسیله این تنظیم‌کننده افزایش یافته و روند کاتابولیسم آن‌ها کاهش می‌یابد، هم‌چنین در حضور TDZ مولکول‌های سایتوکینین درون‌زاد بیشتری در حالت فعال باقی می‌مانند (Jones *et al*., 2007) و یون‌های معدنی در درون سلول تجمع می‌یابند که کلیه این عوامل بر تأثیر مثبت TDZ بر پینه‌زایی و باززایی در انواع ریزنمونه‌ها مؤثر است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش، بهترین محیط برای پینه‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های بذر و سوخ محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون ارزیابی شد. بهترین محیط برای افزایش سریع‌تر وزن تر پینه در ریزنمونه‌های بذر، محیط

www.SID.ir

Archive of SID

دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و برای ریزنمونه‌های سوخ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. هر دو نوع ریزنمونه دارای مزایا و معایبی است که بسته به هدف و شرایط آزمایش، مدت زمان و نوع ریزنمونه در دسترس می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. ریزنمونه فلس که از مرسوم‌ترین ریزنمونه‌ها در مطالعات ریزازدیادی لاله واژگون است دارای آلودگی خارجی و داخلی بسیار زیاد و تعداد محدود بوده و در هنگام برداشت موجب از بین رفتن گیاه مادری این گونه در معرض انقراض خواهد شد. با این وجود، در صورت غلبه کامل بر آلودگی و یا در دسترس‌بودن ریزنمونه‌های استریل که از طریق کشت بافت حاصل شوند، از سرعت تکثیر و اندازه مناسبی برخوردار می‌باشند. اما ریزنمونه‌های بذری با تعداد زیاد در دسترس بوده، آلودگی بسیار کمتر و پاسخ‌دهی بهتر به انواع تنظیم‌کننده‌های رشد داشته و هیچ‌گونه آسیبی به گیاه مادری وارد نمی‌کنند. این ریزنمونه‌ها در صورت در اختیار داشتن زمان کافی از جانب پژوهشگر، به‌جهت رشد و واکشت‌های متعدد در محیط‌های مناسب، ریزنمونه‌های مناسب‌تری خواهند بود. با توجه به اینکه پژوهش حاضر از نخستین مطالعات ریزازدیادی انجام گرفته روی *F. raddeana* است دارای اهمیت بسیاری می‌باشد. القای پینه و باززایی آن، نخستین قدم در حفاظت و تکثیر درون‌شیشه‌ای این گونه رو به انقراض لاله واژگون است که می‌تواند آغازگر مطالعات گسترده‌تر در این گونه ارزشمند بومی باشد.

REFERENCES

1. Aggarwal, D. & Barna, K. S. (2004). Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology*, 13(1), 77-79.
2. Bajaj, Y. P. S., Furmanowa, M. & Olzowska, O. (1988). Biotechnology of the micropropagation of medicinal & aromatic plants. In: Bajaj YPS (Ed), *Biotechnology in Agriculture & Forestry 4, Medicinal & Aromatic Plants I* (pp.15–103.) Springer, Heidelberg.
3. Baranova, M. (1981). The ecologo-morphological peculiarities of the underground organs of the representatives of the genus *Fritillaria* (Liliaceae). *Botanicheskii Zhurnal*. 66 (10), 1369- 1387.
4. Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (2014). *Germination ecology of seeds with morpho-physiological dormancy*. *Seeds*. (2nd ed.) 5 (pp.119-143.) Elsevier Inc.
5. Bryan, J. E. (2002). *Bulbs*. Revised edition. Timber Press Inc., Portland, Oregon.
6. Carasso, V. & Mucciarelli, M. (2014). In vitro bulblet production & plant regeneration from immature embryos of *Fritillaria tubiformis* Gren. & Godr. *Propagation of Ornamental Plants*, 14(3), 101-111.
7. Debiasi, C., Silva, C. G. & Pescador, R. (2007). Micropropagation of *Aloe vera* L., *Revista Brasileria de Plantas Medicinias*, 9, 36-43.
8. Erisen, S., Yorgancilar, M., Atalay, E. & Baboaglu, M. (2010). Prolific shoot regeneration of *Astragalus cariensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100, 229-233.
9. Fay, M. F. (1992). Conservation of rare & endangered plants using in vitro methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 28, 1-4.
10. Fridborg, G., Pedersen, M., Landstrom, L. E. & Eriksson, T. (1978). The effect of activated charcoal on tissue cultures, adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Plant Physiology*; 43, 104–6.
11. Gamborg, O. L., Miller, R. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
12. Ghahreman, A. & Attar, F. (1999). *Biodiversity of plant species in Iran, The vegetation of Iran, plant species, red data of Iran, endemic species, rare species, species threatened by extinction* (Vol. 1). Central Herbarium of Tehran University, Faculty of Science.
13. Gharehyazie, B., Ebrahimie, E., Mohammadi Dehcheshmeh, M., Irannegad, A., Sardari, M. & Salahi Ardacany, A. (2006). Development of commercial protocol for in vitro micropropagation of Fritillaria. International system for agricultural science and technology. Record ID=IR2008000622. Retrieved 2006, *Agricultural biodiversity in FAO*, from http://www.fao.org/biodiversity.
14. Gholami, M. (2007). *Micropropagation of inverted tulip* (*Fritillaria imperialis* L.). MSc. Thesis, University of Avicenna. Hamedan, Iran. (in Farsi)
15. Guo, B., Abbasi, B. H., Zeb, A., Xu, L. L. & Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984-9000.
16. Hamidoghli, S., Chamani, E., Hamidoghli, Y. & Talei, N. (2013). Effect of different plant growth regulators on direct bulblet regeneration from scale explants of *Fritillaria imperialis*. *Journal of Crop Protection*, 5(16), 211-217. (in Farsi)

www.SID.ir

Archive of SID

17. Hao, Y. R., Li, M. S. & Wu, Y. W. (1982). Callus induction & plant regeneration in tissue culture of *Fritillaria pallidiflora*. *Acta Botanica Sinica*, 2, 38-43. (in Chinese with English summary)
18. Helsper, J. P., Bücking, M., Muresan, S., Blaas, J. & Wietsma, W. A. (2006). Identification of the volatile component(s) causing the characteristic foxy odor in various cultivars of *Fritillaria imperialis* L. (Liliaceae). *Plant Research International*, Journal *of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (14), 5087-5091.
19. Jones, M., Cao, J., O'Brien, R., Murch, S. J. & Saxena, P. K. (2007). The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, & ionchannels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. *Plant Cell Reports*, 26(9), 1481-1490.
20. Joshi, S. K., Dhar, U. & andola, H. C. (2007) In vitro bulblet regeneration & evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. A high value medicinal herb of the Himalaya, *Acta horticulturae*, 756, 75-84.
21. Kamari, G. (1996). *Fritillaria* species (Liliaceae) with yellow or yellowish-green flowers in Greece. *Bocconea* 5, 221-238.
22. Nisyawati, K. K. (2013). Effect of ascorbic acid, activated carbon & light duration on explant browning of banana cultivar barangan (*Musa acuminata* L.) in vitro culture. *International Journal of Recent Research and Applied Studies*, 16, 118-123.
23. Kizil, S., Khawar, K. M. & Sesiz, U. (2013). Bulblets regeneration from in vitro improved leaf of *Fritillaria imperialis* L. and *F. persica* L. *Current Opinion in Biotechnology*, (24), S 39.
24. Kulkhanova, D. S., Erst, A. A. & Novikova, T. I. (2015). In vitro regeneration from bulbous scales of *Fritillaria sonnikovae*, an endemic species. *Russian Journal of Developmental Biology*, 46(4), 215-221.
25. Le Nard, M. & De Hertogh, A. A. (1993). *The physiology of flower bulbs*. Elsevier, Amsterdam, (pp. 718- 739). The Netherlands.
26. Li, S. L., Lin, G., Chan, S. W. & Li, P. (2001). Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography* A (909), 207-214.
27. Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X. & Tang, K. (2004). Micropropagation of endangered Chinese aloe. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 76(1), 83-86.
28. Mirdeilami, Z., Heshmati, Gh. & Mazandarani, M. (2012). Introduction to the flora, life forms & geographic diversity of medical plants of arid & semi-arid regions of North-East of Golestan province. *Journal of Iranian Plant Eco-physiological Research*, 7(26), 27-37. (in Farsi)
29. Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A. & Naderi, R. (2007). Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(11), 1875-1879.
30. Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M. & Ebrahimie, E. (2008). Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3), 395-399.
31. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth & bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
32. Murch, S. J. & Saxena, P. K. (2002). Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) *The Science of Nature - Naturwissenschaften*, 89(12), 555-560.
33. Murthy, B. N. S., Murch, S. J. & Saxena, P. K. (1998). Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(4), 267-275.
34. Özcan, S., Parmaksız, I., Mirici, S., Çöçü, S., Uranbey, S., İpek, A., Sancak, C., Sarihan, E.O., Gürbüz, B., Sevimay, C. S. & Arslan, N. (2007). Efficient in vitro bulblet regeneration from immature embryos of endemic & endangered geophyte species. In: Z. Xu. (Ed), *Biotechnology & Sustainable Agriculture 2006 & Beyond*. (pp. 381-383). Springer Science.
35. Palmer, C. D. & Keller, W. A. (2011). Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 105 (1), 129-134.
36. Petrić, M., Jevremović, S., Trifunović, M., Tadić, V., Milošević, S., Dragićević, M. & Subotić, A. (2013). The effect of low temperature and GA3 treatments on dormancy breaking and activity of antioxidant enzymes in *Fritillaria meleagris* bulblets cultured in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(11), 3223-3236.
37. Pretto, F. R. & Santarem, E. R. (2000). Callus formation & plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 62 (2), 107-113.
38. Rechinger, K. H. (1990). *Fritillaria* L. In: K.H. Rechinger (Ed), *Flora Iranica*., 165 (pp. 61–76.) Akademische druck -u-verlagsantalt. Graz.
39. Rix, E. M. (1977). *Fritillaria* L. (Liliaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany*, 1(2), 75-95.
40. Subotic, A., Trifunović, M., Jevremović, S. & Petrić, M. (2010). Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Frittilaria meleagris*. *Biologia Plantarum*, 54(3), 592-596.

www.SID.ir

Archive of SID

41. Sudha, C. G. & Seeni, S. (1994). In vitro multiplication & field establishment of *Adhatoda beddomei* C. B. Clarke, a rare medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 13, 203-207.
42. Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618-631.
43. Witomska, M. & Lukaszewska, A. (1997). Bulbet regeneration in vitro from different explants of *Fritillaria imperialis*. *Acta Horticulturae*, 430, 331-338.
44. YanLi, C., Yuan, C., FengXia, G., YuHong, L. & Tian, L. (2010). A study on soaking & germination characteristics of *Fritillaria przewalskii* seeds. *Acta Prataculturae Sinica*, 19(4), 41-46.
45. Yaojia, Z., Hongmei, W. & Ruilian, Z. (1994). A preliminary study on the ecological characteristics & germinating law of the seeds of *Fritillaria yuzhongensis* in the Maxian mountain region of Gansu Province [China]. *Acta Ecologica Sinica* (China), *Agricultural biodiversity in FAO.* Retrieved 1992 from http://www.fao.org/ biodiversity.
46. Yu, J., Wei, J. H., Chen, S. L., Dai, Y. & Yang, C. M. (2008). Dormancy & germination characteristics of *Fritillaria cirrhosa* seed [J]. *Chinese Traditional & Herbal Drugs*, *7*, 1081-1084.
47. Zhiliang, L. & Feng, P. Y. L. (1989). Identification of inhibitor in the aqueous extract of *Fritillaria polliflora* Schrek seeds [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, *5*, 004.
48. Zhou, B., Wei, X., Wang, R. & Jia, J. (2010). Quantification of the enzymatic browning & secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. *Asian journal of Traditional Medicine*, 5(3), 109-116.
49. Ziv, M. & Lilien-Kipnis, H. (2000). Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro. *Plant Cell Reports*, 19 (9), 845-850.

www.SID.ir