Archive of SID

مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۱ شماره ۳ صفحه های ۲۲۱ تا ۲۳٤ (۱۳۸۹)

سوخک‌زایی مستقیم در سوسن *Lilium longiflorum* cv. 'Gironde' در شرایط درون شیشه‌ای[۱]

DIRECT *IN VITRO* BULBLET PRODUCTION IN *LILIUM LONGIFLORUM* CV. 'GIRONDE'

نرگس مجتهدی، پریسا کوباز، امید دبیراشرافی و علی‌اکبر حبشی[۲]

چکیده

افزایش و تولید گیاهان زینتی با استفاده از فن کشت بافت، یکی از روش‌های نوین پرورش این گیاهان می‌باشد. با توجه به وابستگی کشور به واردات سوخ سوسن، تلاش شده است تا روشی مناسب جهت افزایش انبوه این گیاه در داخل کشور به دست آمد. تولید سوسن‌های تجاری از طریق سوخک‌زایی مستقیم با استفاده از قطعه های فلس در شرایط درون شیشه از مهمترین روش‌های افزایش این گیاه می‌باشد. بنابراین جهت یافتن بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد جهت سوخک‌زایی، غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آمینوپیورین (BAP) (۳، ۰/۳،۰/۰۳، ۰ میلی‌گرم در لیتر) در آمیخته با غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید (NNA) (۰/۳، ۰/۰۳، ۰ میلی‌گرم در لیتر) به عنوان یکی از عوامل اصلی در سوخک‌زایی مستقیم *Lilium longiflorum* cv. 'Gironde' یکی از ارقام دو رگه آسیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌ها پس از گندزدایی سطحی فلس‌ها و برش ناحیه قاعده‌ای، در محیط کشت پایه MS همراه با ٦٪ ساکارز و ۰/۷٪ آگار قرار گرفتند. همچنین بسترهای مختلف جهت سازگاری و رشد سوخک‌های کشت بافتی نیز مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها، در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی اجرا و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن صورت گرفت. ویژگی های مورد ارزیابی شامل وزن هر سوخک تولید شده در هر ریزنمونه، تعداد سوخک‌های تولید شده در هر ریزنمونه، ارتفاع هر سوخک تولید شده در هر ریزنمونه، محل تشکیل سوخک‌های هر ریزنمونه (زیرین، جانبی، انتهایی)، تعداد فلس در هر سوخک تولید شده در هر ریزنمونه و درصد ریشه‌زایی بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر ساده تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر تمامی ویژگی های (وزن، تعداد فلس در هر ریزنمونه، طول، قطر و تعداد سوخک‌های تولید شده) معنی‌دار بود و آمیخته هورمونی BAP ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر و NAA ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بهترین آمیخته هورمونی از لحاظ تعداد سوخک‌های تولید شده و ریشه‌زایی بود. ناحیه زیرین ریزنمونه‌ها، بیشترین تعداد سوخک را در مقایسه با نواحی جانبی و انتهایی تولید کردند. در آزمون بررسی بهترین آمیخته خاک, مشخص گردید که پیت بهترین بستر برای رشد سوخک‌های کشت بافتی رقم 'ژیرونده' بود.

واژه های کلیدی: بنزیل‌آمینوپیورین، سوخک‌زایی مستقیم، شرایط درون شیشه‌ای، نفتالن استیک اسید.

۱- تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۵

۲- به ترتیب مربی، پژوهشیار (pkoobaz@abrii.ac.ir)، کارشناس و استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، جمهوری اسلامی ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سوسن یکی از ۲۲۰ جنس متعلق به تیره سوسن سانان[1] و تک لپه می‌باشد که حدود ۱۰۰ گونه را شامل می‌شود که همگی از گونه‌های زینتی می‌باشند. بسیاری از ارقام سوسن که دارای ارزش زینتی بوده و به عنوان گل‌های شاخه‌بریدنی استفاده می‌شوند، از تلاقی‌های بین گونه‌ای به وجود آمده‌اند. دورگه‌های شرقی و آسیایی سوسن به طور وسیعی در بازارهای بین‌المللی خرید و فروش می‌شوند (۲۲). این گل در سال ۱۹۹٦ در رده سوم تولید در تایوان، رده چهارم در ژاپن و رده پنجم در کره بوده است و به طور معمول بعد از چند گل مهم در دنیا یعنی رز، داوودی و میخک قرار می‌گیرد و بر طبق آخرین اطلاعات، رتبه هفتم را در بین گل‌های شاخه بریدنی دنیا به خود اختصاص داده است (۱). از نظر تولید با روش کشت بافت در سال ۱۹۹٦ در اروپا با تعداد ۳ میلیون گیاه، در رده نهم تولیدهای کشت بافتی قرار گرفت و این نشان از اهمیت این گل در بازار جهانی و همچنین پتانسیل افزایش این گیاه به روش کشت بافت دارد (۱).

در کشورهایی که خاستگاه جنس سوسن هستند، بررسی های گسترده‌ای برای افزایش و معرفی آن به بازار جهانی صورت گرفته است. افزایش سوخ سوسن به طور معمول به وسیله فلس سوخ زمانی که خفتگی آن شکسته شده باشد، انجام می‌شود و افزایش با این روش بستگی به گونه، رقم و اندازه فلس دارد. به دلیل کندی روش افزایش سنتی، ریزافزایی یکی از روش های کارامد برای افزایش رویشی این گیاهان محسوب می‌شود. به علت فواید ریزافزایی، از جمله سرعت بالای افزایش، حفظ کلیه ویژگی های گیاه منبع و تسریع در گلدهی، این تکنیک، بیش از روش‌های دیگر مورد توجه قرار گرفته است (۹). این روش سطح افزایش را چندین برابر افزایش می‌دهد (۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲٤) و امکان تولید گیاهان عاری از ویروس و دیگر بیماری‌ها را فراهم می‌کند (۲۰، ۲۱). همچنین با استفاده از تکنیک کشت بافت، امکان افزایش انبوه این گیاه و صدور آن به بازار جهانی گل فراهم گردید و هم‌اکنون نیز بررسی هایی برای افزایش بیشتر و کیفیت بالاتر سوخک‌های به دست آمده از کشت بافت، در حال انجام است. این کار همزمان در کشورهای دیگر همچون کره و تایوان نیز در حال انجام است و هر یک از این کشورها با اتکا به گونه‌های بومی خود سعی در افزایش و صدور آن به بازار جهانی دارند (۱۷).

در بررسی‌های مختلفی که در مورد ریزافزایی سوسن در دنیا صورت گرفته است، اثر تنظیم کننده‌های رشد، غلظت ساکارز، دمای مناسب برای رشد سوخک‌ها و موقعیت قطعه های فلس در ارقام مختلف بررسی شده است. برای مثال، غلظت‌های بالای سایتوکینین و غلظت‌های کم اکسین برای تولید سوخک‌ها در *Lilium japonicum* ضروری بود و غلظت ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل پینه[2] را افزایش داد (۱۲). اما در غلظت بیش از ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA با یا بدون BAP، تشکیل سوخک‌ها در چند رقم بومی کره کاهش یافت (۱۰).

در بررسی دیگری که به منظور افزایش و استقرار سوخک‌های حاصل از کشت بافت گونه *Lilium japonicum* از بخش‌های مختلف فلس و فلس کامل در محیط کشت پایه موراشیگی و اسکوگ (MS) به همراه NAA ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر انجام شد، به طور میانگین، ریزنمونه‌های قاعده‌ای ۲/۲ عدد سوخک تولید کردند در حالی که ریزنمونه‌های جانبی و انتهایی فقط ۰/۳ عدد سوخک تولید کردند و وزن سوخک‌های حاصل از ریزنمونه‌های زیرین بیشتر بود (۱٤).

۱- Liliaceae ۲- Callus

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشگران مختلف از روش‌های متفاوتی برای سوخک‌زایی استفاده کرده‌اند که در بیشتر موارد، سوخک‌زایی به صورت غیر مستقیم انجام شده است. برای مثال، سوخک‌زایی غیر مستقیم از کشت میله‌های پرچم همراه یا بدون بساک نیز انجام شده است. در کشت میله‌ها همراه با بساک ابتدا *Lilium longiflorum* Thunb. پینه تشکیل شد و سپس سوخ، شاخساره و ریشه‌ها نیز ایجاد شدند در صورتی که در کشت میله‌های پرچم بدون بساک، پینه ایجاد نشد. قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط کشت Gamborge's B_5 در تاریکی یا محیط کشت N6 همراه با ساکارز ۹٪ در شرایط تاریکی یا روشنایی، بهترین محیط‌های کشت جهت تولید سوخک بود (۵). باززایی از کشت لایه‌های نازک یاخته‌ای ساقه‌های جوان *Lilium longiflorum* انجام شد. گیاهچه‌ها، ٦٠ روز پس از کشت در محیط کشت نیم غلظت MS همراه با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار بدون زغال فعال تولید شدند (۱۳). پژوهشگران، روش کار افزایش *Lilium nepalense* D. Don به عنوان یکی از گیاهان دارویی با ارزش کشور نپال را، به دست آورده‌اند. جوانه‌های جانبی از ریزنمونه‌های دو قلوی فلس (دو قطعه از فلس که به یک بخش نازک صفحه قاعده‌ای متصل بودند) به دست آمده از سوخ های بالغ باززایی شدند. افزایش در محیط کشت MS همراه با ۲۰ میکرومولار زآتین با استفاده از شاخه‌های باززایی شده که به صورت طولی برش زده شده بود، انجام شد. به طور میانگین، بیش از هفت شاخه از هر ریزنمونه در یک دوره ٤ هفته‌ای به دست آمد. پس از ریشه‌زایی، گیاهچه‌های همگروه شده به طور موفقیت‌آمیزی به شرایط برون شیشه‌ای منتقل شدند. این روش در کشور نپال به عنوان یک روش کاربردی جهت تولید این گیاه و حفاظت از ذخایر طبیعی گونه‌های دیگر قابل استفاده است (۲۳).

در بررسی که روی گونه *Lilium concolor* رقم 'Partheneion' انجام شد فلس‌ها به صورت عرضی به سه قسمت مساوی بخش‌های انتهایی، جانبی و زیرین تقسیم شدند. هر قسمت روی محیط کشت MS حاوی یا فاقد تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP در زیر نور قرار گرفت. یافته‌های به دست آمده نشان داد که بدون مواد تنظیم کننده رشد، بهترین نتایج از بخش های زیرین فلس به دست آمد و هیچ سوخکی از قسمت انتهایی فلس حاصل نگردید (۱۰).

سوخک‌زایی دروغین در گونه *Lilium longiflorum* حاصل از گره‌های نوک ساقه نیز انجام شده است. نوک شاخه های حاصل از ساقه‌های سوخ های در حال خفتگی، در محیط کشت نیم غلظت MS همراه با BAP ۱ میکرومولار کشت شدند. سوخک‌های دروغین یک ماه پس از کشت در هر گره تشکیل شد. به طور میانگین، حدود ۳۲ سوخک دروغین در همه گره‌های حاصل از یک سوخک تشکیل شد. سوخک‌های دروغین در محیط نیم غلظت MS همراه با BAP ۲/۳ میکرو مولار، گیاهچه تشکیل دادند. شاخه‌ها در محیط نیم غلظت MS شامل NAA ۰/۱ میکرومولار ریشه تشکیل دادند. با استفاده از این سیستم، حدود ۸۰ گیاهچه تشکیل شد که در گلخانه به مدت ۳ ماه سازگار شدند و سپس به مدت ۸ ماه در باغ آزمایشی کشت گردیدند (١٦).

در این پژوهش، اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر سوخک‌زایی مستقیم یکی از ارقام تجاری سوسن به نام 'Zhyrvndh' از دورگه‌های آسیایی در شرایط درون شیشه‌ای برای به دست آوردن بهترین آمیخته لازم برای سوخک زایی بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

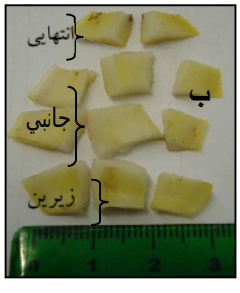
سوخ‌های سوسن رقم 'ژیرونده' به عنوان رقم انتخابی از دورگه آسیایی از طریق شرکت ساعی‌گل (وارد کننده سوخ های سوسن تجاری از کشور هلند) خریداری شد و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد.

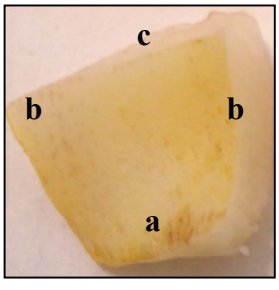
گندزدایی سطحی

فلس‌های جانبی هر سوخ جدا شده و با روش غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر سترون به مدت ۵ دقیقه و سپس غوطه‌وری در حمام آب گرم ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤٥ دقیقه گندزدایی سطحی انجام شد.

استقرار در محیط کشت و آزمایش‌های سوخک‌زایی

اثر سه غلظت NAA (۰/۳، ۰/۰۳، ۰ میلی‌گرم در لیتر) و چهار غلظت BAP (۳، ۰/۳، ۰/۰۳، ۰ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی ویژگی تعداد سوخک‌ها، مناطقی از هر ریزنمونه که سوخک‌ها از آن منشاء می‌گیرند (زیرین، جانبی و انتهایی) نیز به عنوان یک فاکتور، مورد بررسی قرار گرفت (شکل های ۱، ۲، ۳). آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۵ ریزنمونه انجام شد. در این آزمایش از بخش قاعده‌ای فلس‌های جانبی برای بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر سوخک‌زایی استفاده شد. محیط‌کشت مورد استفاده در آزمایش‌ها، شامل محیط پایه MS همراه با ویتامین‌های تیامین با غلظت ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر و میواینوزیتول با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و آگار ۰/۷٪ بود. قطعه های فلس پس از گندزدایی در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت قرار گرفتند. برای ایجاد فضای بیشتر برای رشد و تولید سوخک در فلس‌ها، محیط کشت به صورت شیبدار در لوله‌های آزمایش جامد گردید و در نهایت در هر لوله یک ریزنمونه کشت گردید.





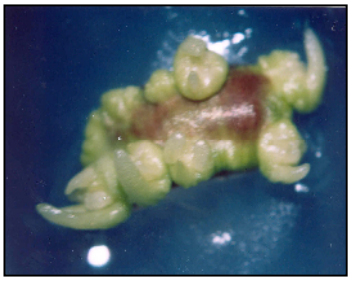


Fig. 1. a) Central scale b) Basal, lateral and distal explants of cv. 'Gironde'.

شکل ۱- الف- فلس جانبي ب- ریزنمونه‌های زیرین، جانبي و انتهایی رقم 'ژیرونده'.

Fig. 2. Basal explants of cv. 'Gironde': a- Basal b- Lateral c: Distal position.

شکل ۲- ریز نمونه حاصل از فلس زیرین رقم 'ژیرونده': محل های a: زیرین b. جانبی c. انتهایی.

Fig. 3. *In vitro* bulblet production of cv. 'Gironde' one month after culture.

شکل ۳- سوخک‌زایی رقم 'ژیرونده' یک ماه پس از کشت در شرایط درون شیشه‌ای.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش سازگاری

این آزمایش جهت یافتن بهترین آمیخته خاکی[1] برای رشد سوخک‌های کشت بافتی، انجام شد. ترکیب های خاک مورد بررسی عبارت بودند از:

ماسه: پیت:ورمیکولایت:شن (۱:۱:۱:۱)، رس:پیت (۱:۱)، رس:شن (۱:۱)، رس:ورمیکولایت (۱:۱)، رس:پیت:ورمیکولایت (۱: ۲: ۱) و پیت.

ترکیب های یاد شده به داخل شیشه‌های کشت ریخته شده و در تمام شیشه‌ها ۲۰ میلی لیتر محیط پایه نیم غلظت MS اضافه گردید. شیشه‌ها و محتویات آن‌ها قبل از کشت گندزدایی شدند. پس از گندزدایی نمودن شیشه‌ها، سوخک‌ها، به داخل محیط‌های مورد نظر انتقال یافتند. آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۱۰ تکرار و هر تکرار حاوی ۱۰ ریزنمونه (سوخک) انجام شد. شیشه‌ها به دمای ٤ درجه سلسیوس انتقال یافتند و پس از یک ماه به فیتوترونی[2] با دمای ٢٤ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از دو ماه، تعداد سوخک‌های تندیده در هر شیشه و میانگین تعداد برگ‌های رشد یافته از هر سوخک به عنوان ملاک انتخاب بهترین آمیخته خاک شمارش شدند.

شرایط نگهداری

شرایط دمایی برای تمام تیمارها یکسان و ریزنمونه‌های کشت شده در دمای ۱±۲٤ درجه سلسیوس نگهداری شدند. از نظر شرایط محیطی تیمارها در شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

ویژگی های مورد بررسی

پس از دو ماه از کشت ریزنمونه‌های فلس در محیط‌های مورد نظر، ویژگی های زیر یادداشت برداری گردیدند. با توجه به این که هر ریزنمونه تعداد متفاوتی سوخک تولید می‌کند، ویژگی ها در هر سوخک تولید شده بررسی شدند. وزن سوخک تولید شده در هر ریزنمونه، ارتفاع سوخک تولید شده در هر ریزنمونه، قطر سوخک تولید شده در هر ریزنمونه، محل تشکیل سوخک‌ها در هر ریزنمونه (مناطقی در هر ریزنمونه که سوخک‌ها از آن منشاء می‌گیرند) شامل مناطق زیرین، جانبی و انتهایی، تعداد فلس در هر سوخک تولید شده در هر ریزنمونه و درصد ریشه‌زایی سوخک‌ها بررسی شدند.

جمع‌آوری داده‌ها و تجزیه های‌آماری

داده‌های جمع‌آوری شده از آزمایش‌های گوناگون، در مراحل مختلف با استفاده از نرم افزارهای Excel و SAS مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و میانگین‌ها بر اساس روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. قبل از تجزیه واریانس در صورت نیاز، داده‌ها با استفاده از تبدیل جذری تبدیل شدند تا توزیع آن ها نرمال شود.

۱- Soil mixture ۲- Phytotron

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

نتایج نشان داد که اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر تمامی ویژگی های (وزن، تعداد فلس در هر سوخک، طول، قطر و تعداد سوخک‌های تولید شده) معنی‌دار بود (جدول های ۱ و ۲). همچنین BAP بر درصد ریشه‌زایی اثر معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که BAP با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر، سوخک‌های سنگین‌تر با طول و قطر بزرگتر و تعداد فلس‌های بیشتر ولی بدون ریشه در مقایسه با غلظت‌های دیگر BAP تولید کرد (جدول ۱). همچنین NAA با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر تاثیرهای معنی‌داری بر تمام ویژگی ها داشت و سوخک‌های ایجاد شده دارای بالاترین درصد ریشه‌زایی بودند (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت BAP بر سوخک‌زایی سوسن رقم 'ژیرونده' در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 1. Effect of BAP on bulblet production of *Lilium longiflorum* cv.'Gironde' under *in vitro* conditions.

ریشه‌زایی (درصد) Rooting (%)	قطر سوخک (میلی‌متر) Bulblet diameter (mm)	طول سوخک (میلی‌متر) Bulblet length (mm)	تعداد فلس در هر سوخک Number of scales in each bulblet	وزن سوخک (میلی‌گرم) Bulblet weight (mg)	بنزیل‌آمینوپیورین (گرم در لیتر) (BAP) ($g\ l^{-1}$)
25.70a	3.05c	3.58c	2.91c	9.98b	0.00
36.24a	4.10b	4.02b	3.98b	16.82a	0.03
5.40b	4.24b	4.38b	4.26b	16.63a	0.30
0.00b	5.30a	4.85z	4.96a	16.25a	3.00

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

† در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون آماری دانکن در سطح آماری ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت NAA بر سوخک‌زایی سوسن رقم 'ژیرونده' در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 2. Effect of NAA on bulblet production of *Lilium longiflorum* cv.'Gironde' under *in vitro* conditions.

ریشه‌زایی (درصد) Rooting (%)	قطر سوخک (میلی‌متر) Bulblet diameter (mm)	طول سوخک (میلی‌متر) Bulblet length (mm)	تعداد فلس در هر سوخک Number of scales in each bulblet	وزن سوخک (میلی‌گرم) Bulblet weight (mg)	نفتالن استیک اسید (گرم در لیتر) (NAA) ($g\ l^{-1}$)
13.73a†	3.17b	3.35b	3.35b	8.66b	0
16.59a	4.18a	4.27a	3.91a	18.11a	0.03
20.24a	4.21a	4.29a	4.13a	15.24a	0.3

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

† در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون آماری دانکن در سطح آماری ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

برهمکنش BAP و NAA بر وزن سوخک و تعداد فلس در هر سوخک نشان داد که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت۰/۳ یا ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، سوخک‌های سنگین‌تری که فلس‌های بیشتری دارند را تولید کرد (شکل های ٤ و ٥). غلظت ۰/۰۳ میلی گرم در لیتر BAP و غلظت ۰/۳ میلی گرم در لیتر NAA، تعداد سوخک‌های بیشتری از هر محل تولید کردند (شکل ٦). همچنین، منطقه زیرین ریزنمونه نسبت به مناطق جانبی و انتهایی تعداد بیشتری سوخک تولید کرد (شکل ۷). غلظت ۰/۰۳ میلی گرم در لیتر BAP، بیشترین درصد ریشه‌زایی را نشان داد. با توجه به این که داشتن ریشه در سوخک‌ها، یک ویژگی مثبت محسوب می‌شود و جهت بلوغ و رشد بعدی سوخک‌ها ضروری است، نمی‌توان از این ویژگی چشم‌پوشی کرد. بنابراین با توجه به معنی‌دار نبودن تفاوت بین غلظت‌های ۳ و ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در وزن سوخک‌ها و تفاوت اندکی که بین میانگین‌های طولی و قطری سوخک‌های تولیدی در این غلظت‌ها مشاهده شد، غلظت ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به عنوان غلظت مناسب سایتوکینین، پیشنهاد شد.

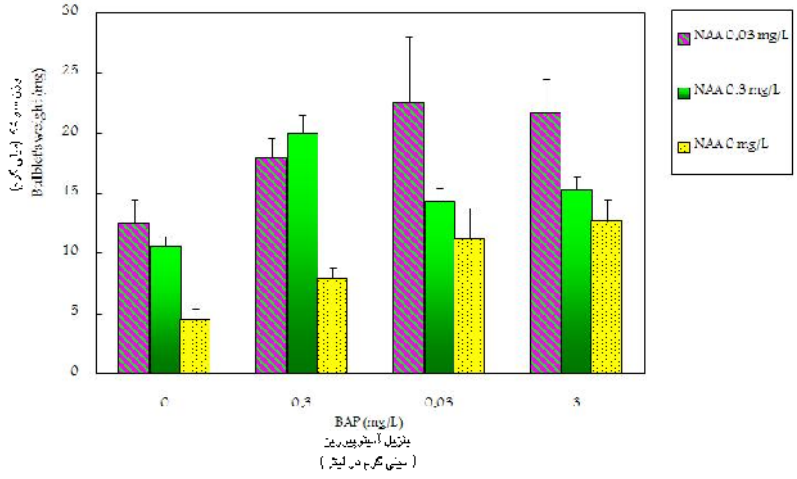


Fig. 4. Interaction of BAP and NAA on bulblet weight per explant.

شکل ٤- برهمکنش BAP و NAA بر وزن سوخک‌های تولید شده در هر ریزنمونه.

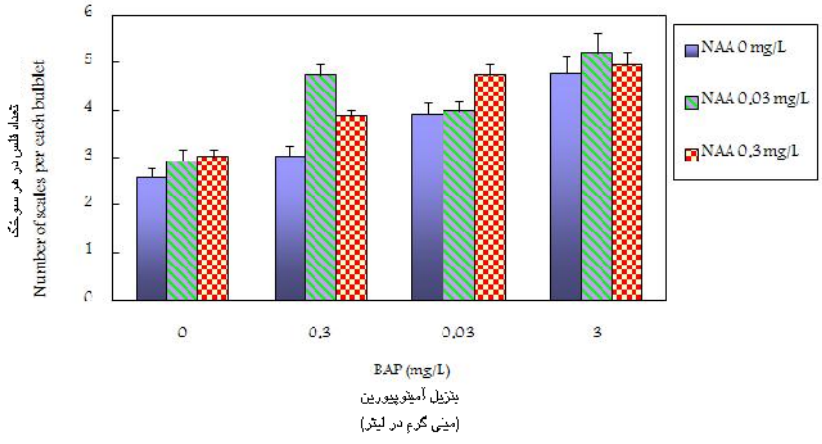


Fig. 5. Interaction of BAP and NAA on number of scales per bulblet.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ٥- برهمکنش BAP و NAA بر تعداد فلس در هر سوخک.

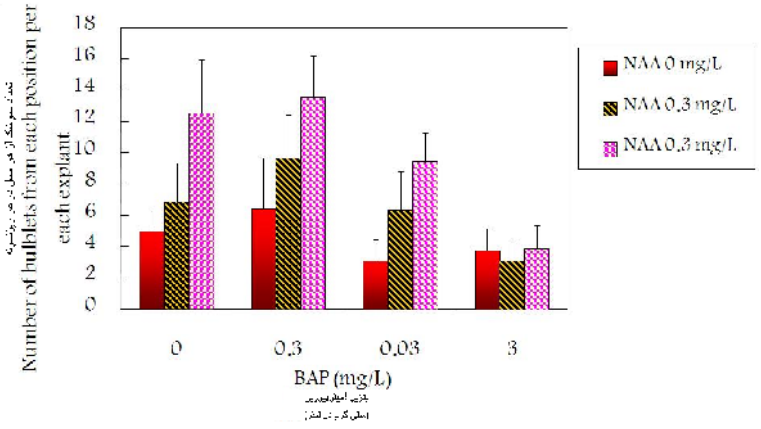


Fig. 6. Interaction of BAP and NAA on number of bulblets per position.

شکل ٦- برهمکنش BAP و NAA بر تعداد سوخک‌های تولید شده از هر محل.

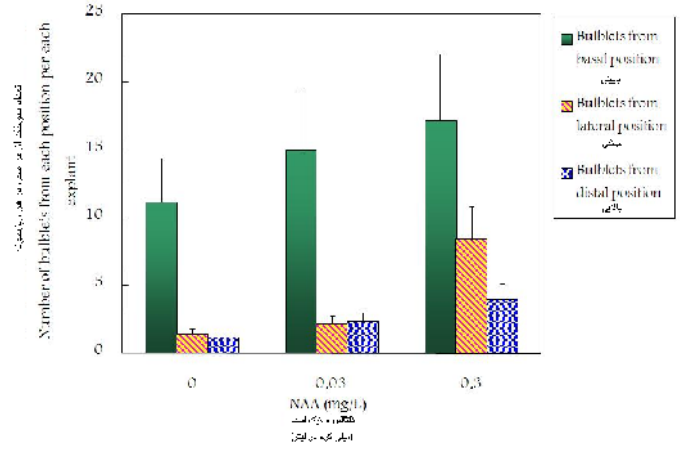


Fig. 7. Interaction of NAA and position of bulblet production in explant on number of bulblets per each position.

شکل ٧- برهمکنش NAA و محل تشکیل سوخک در هر ریزنمونه بر تعداد سوخک تولید شده از هر محل.

محل تشکیل سوخک‌ها در هر ریزنمونه نیز بر تعداد سوخک‌های تولید شده اثر معنی‌دار داشت. تیمار بدون BAP و NAA، بیشترین تعداد سوخک را در منطقه زیرین ریزنمونه‌ها تولید نمود (جدول های ٣، ٤، ٥).

بررسی بهترین آمیخته خاکی

نتایج نشان داد که پیت به تنهایی مناسب‌ترین بستر جهت کشت و سازگاری سوخک‌های کشت بافتی است (جدول ٦). تعداد سوخک‌های تندیده در بستر پیت ٩٤٪ و میانگین تعداد برگ‌های رشد یافته از هر سوخک ١/٦٤ بود.آمیخته رس: شن از لحاظ تعداد سوخک‌های تندیده و میانگین تعداد برگ‌های رشد یافته از هر سوخک به

www.SID.ir

Archive of SID

ترتیب (۸۶٪ و ۱/۳۸) نیز نتایج مناسبی نشان داد به نظر می‌رسد به دلیل کوچک بودن سوخک‌ها، امکان رشد و تندش آن ها بیشتر بوده است (شکل های ۸ و ۹).

جدول ۳- اثر بنزیل‌آمینوپیورین بر تعداد سوخک در هر ریزنمونه در سوسن رقم 'ژیرونده' در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 3. Effects of BAP on number of bulblets per explant of *Lilium longiflorum* cv.'Gironde' under *in vitro* conditions.

بنزیل‌آمینوپیورین (میلی‌گرم در لیتر) BAP (mg l^{-1})	تعداد سوخک در هر ریزنمونه Bulblets number per explants
0.00	8.14 ab†
0.03	9.88 ab
0.30	6.29b
3.00	3.59c

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

† در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون آماری دانکن در سطح آماری ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ٤- اثر محل تشکیل سوخک در هر ریزنمونه بر تعداد سوخک تولید شده از محل تشکیل سوخ در هر ریزنمونه در سوسن رقم 'ژیرونده' در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 4. Effect of position of bulblet formation on number of bulblets per each position of *Lilium longiflorum* cv. 'Gironde' under *in vitro* conditions.

محل تشکیل سوخک در هر ریزنمونه Position of bulblet production in each explant	تعداد سوخک تولید شده از هر محل در هر ریزنمونه Bulblets number from each position per each explant
زیرین (Basal)	14.44a†
جانبی (Lateral)	4.00b
انتهایی (Distal)	2.50b

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

† در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون آماری دانکن در سطح آماری ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ٥- اثر NAA بر تعداد سوخک در هر ریزنمونه در سوسن رقم 'ژیرونده' در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 5. Effect of NAA on number of bulblets per each explant of *Lilium longiflorum* cv. 'Gironde' under *in vitro* conditions.

نفتالن‌استیک اسید (میلی‌گرم در لیتر) NAA (mg l^{-1})	تعداد سوخک در هر ریزنمونه Bulblets number per explant
0.00	9.86a
0.03	8.50b
0.30	4.58c

www.SID.ir

Archive of SID

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

† در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون آماری دانکن در سطح آماری ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ٦- اثرآمیخته خاک بر رشد سوخک‌های کشت بافتی سوسن رقم 'ژیرونده'.

Table 6. Effect of soil substrate on *in vitro* bulblet's growth of *Lilium longiflorum* cv. 'Gironde'.

نوع رقم Type of cultivar	'ژیرونده' 'Gironde'	
ترکیب خاک Soil mixture	تعداد سوخک‌های تندیده Number of germinated bulblets	میانگین تعداد برگ‌های رشد یافته از هر سوخک Mean of leaf numbers from bulblet
ماسه: پیت:ورمیکولایت: شن Sand:Peat:Vermiculite: Gravel (1:1:1:1)	65	1.52
رس:پیت Clay:Peat (1:1)	0	0
رس:شن Clay:Gravel (1:1)	86	1.38
رس:ورمیکولایت Clay:Vermiculite (1:1)	0	0
رس: پیت:ورمیکولایت Clay:Peat: Gravel	0	0
پیت Peat (1:2:1)	94	1.64

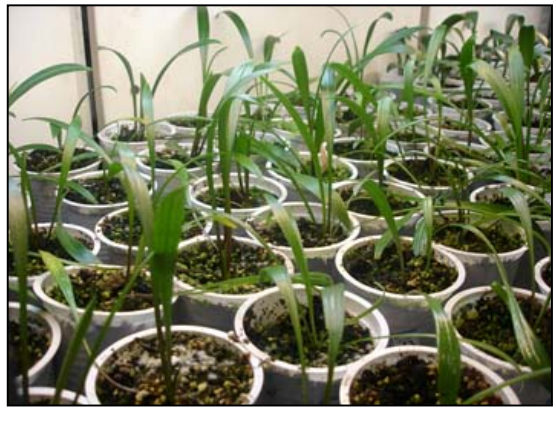


Fig. 8. *In vitro* bulblets of cv. 'Gironde' one month after acclimatization.

شکل ۸- سوخک های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای رقم ژیرونده یک ماه پس از سازگاری.

Fig. 9. *In vitro* bulblets of cv. 'Gironde' two months after culture.

شکل ۹- سوخک‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای از رقم 'ژیرونده' ۲ ماه پس از کشت.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

معنی‌دار بودن اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر تمامی ویژگی ها و تاثیر BAP با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر بر تولید سوخک‌های سنگین‌تر با طول و قطر بزرگتر و تعداد فلس‌های بیشتر ولی بدون ریشه در مقایسه با غلظت‌های دیگر BAP تایید کننده نتایج پژوهشگران دیگر مبنی بر تاثیر سطوح مختلف NAA بر ویژگی های اندازه‌گیری شده بود. برای مثال، بر اساس گزارش معمارمشرفی و همکاران (۳)، بیشترین تعداد سوخک و بیشترین وزن سوخک در کشت بافت سوسن چلچراغ در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. همچنین، بیشترین وزن سوخک و تعداد ریشه در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم BAP به دست آمد. در حالی که بیشترین تعداد سوخک، درصد باززایی و درصد ریشه‌زایی در تیمار بدون تنظیم‌کننده‌های رشد حاصل شد (۳). در پژوهشی دیگر روی ریزافزایی سوسن 'چلچراغ' و رقم 'ژیرونده'، بیشترین تعداد و وزن سوخک از سوسن چلچراغ و بیشترین تعداد ریشه از رقم 'ژیرونده' حاصل شد. در سوسن چلچراغ محیط کشت شاهد و محیط کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین تعداد سوخک را تولید کردند. بیشترین وزن سوخک از محیط کشت دارای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. رقم 'ژیرونده'، بیشترین تعداد و وزن سوخک را در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید کرد (۲).

برهمکنش BAP و NAA بر وزن سوخک و تعداد فلس در هر سوخک نشان داد که غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت۰/۳ یا ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، سوخک‌های سنگین‌تری که فلس‌های بیشتری دارند را تولید کرد (شکل های ٤ و ٥). غلظت ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA، تعداد سوخک‌های بیشتری از هر محل، تولید کردند (شکل ٦). همچنین، منطقه زیرین ریزنمونه نسبت به مناطق جانبی و انتهایی، تعداد بیشتری سوخک تولید کرد (شکل ۷). غلظت ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر BAP ، بیشترین درصد ریشه‌زایی را نشان داد. با توجه به این که داشتن ریشه در سوخک‌ها، یک ویژگی مثبت محسوب می‌شود و جهت بلوغ و رشد بعدی سوخک‌ها ضروری است، این ویژگی اهمیت خاص خود را دارد. بنابراین، با توجه به معنی‌دار نبودن تفاوت بین غلظت‌های ۳ و ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در وزن سوخک‌ها و تفاوت اندکی که بین میانگین‌های طولی و قطری سوخک‌های تولیدی در این غلظت‌ها مشاهده شد، غلظت ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به عنوان غلظت مناسب سایتوکینین، پیشنهاد می‌گردد. نتایج این پژوهش، مشابه یافته‌های پژوهشگران دیگر در استفاده از سایتوکینین‌ها جهت سوخک‌زایی است، اما در بیشتر موارد، از سوخک‌زایی به صورت غیر مستقیم جهت ریزافزایی ارقام مختلف سوسن استفاده شده است. برای مثال، سوخک‌زایی غیرمستقیم از کشت میله‌های پرچم و لایه‌های نازک یاخته‌ای ساقه‌های جوان سوسن *Lilium longiflorum* Thunb. انجام شده است (٥ ، ۱۳). همچنین، پژوهشگران، روش کار افزایش *Lilium nepalense* D.Don با استفاده از جوانه‌های جانبی حاصل از ریزنمونه‌های دو قلوی فلس (دو قطعه از فلس که به یک بخش نازک صفحه قاعده‌ای متصل بودند) سوخ های بالغ در محیط کشت MS همراه با ۲۰ میکرومولار زآتین را به دست آورده‌اند (۲۳). مزیت استفاده از روش سوخک‌زایی مستقیم، حذف مرحله تولید پینه است که افزون بر کاهش تنوع (٤)، موجب افزایش سرعت باززایی نیز می‌گردد (۸).

www.SID.ir

Archive of SID

تشکیل سوخک‌ها در منطقه زیرین ریزنمونه‌ها توسط پژوهشگران دیگر گزارش شده است و نتایج آنان را تایید می‌کند. برای مثال، فلس‌های سوخ رقم 'Star Gazer' از دورگه‌های شرقی به عنوان ریزنمونه کشت شدند. سوخک‌ها در منطقه زیرین فلس‌های بریده شده در محیط کشت MS همراه با کندکننده‌های رشد تولید شدند. آلار[۱]، سایکوسل[۲] و پاکلوبوترازول[۳] با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد بیشتری سوخک در مقایسه با گیاهان شاهد تولید کردند، اگرچه تعداد سوخک‌ها با افزایش غلظت کندکننده‌های رشد، کاهش یافت (۱۱). در این رابطه می‌توان مساله قطب گرایی[۴] در ریزنمونه‌ها را مورد تاکید قرار داد که توسط پژوهشگران دیگر نیز مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهشگران جهت باززایی، از ریزنمونه‌های برگ و گره‌های ساقه سه رقم از دو دورگه آسیایی سوسن 'Elite' و 'Pollyanna' و دورگه شرقی 'Star Gazer' استفاده کردند به طوری که ریزنمونه‌ها با توجه به قطب گرایی در محیط کشت قرار گرفتند. شاخه‌های باززایی شده، تنها از منطقه زیرین ریزنمونه‌ها منشاء گرفتند و منطقه انتهایی ریزنمونه‌ها در ۹۰٪ موارد، هیچ باززایی نشان ندادند و دچار سوختگی[۵] شدند (٦).

مناسب بودن پیت به عنوان بستر جهت کشت و سازگاری سوخک‌های کشت بافتی با نتایج بریکل[٦] (۷) مطابقت داشت. به نظر می‌رسد پیت به علت جذب و نگهداری آب به مدتی طولانی‌تر نسبت به سایر ترکیب ها، بستر مناسب‌تری را جهت سازگاری و رشد سوخک‌های کشت بافتی فراهم می‌کند. بنابراین استفاده از پیت جهت سازگاری و رشد و نمو سوخک‌های کشت بافتی این رقم توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی می‌توان نتایج را به چند دسته مهم طبقه‌بندی نمود.

۱- تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده (NAA و BAP) بر تمامی ویژگی های مورد بررسی جهت سوخک‌زایی مستقیم سوسن رقم 'ژیرونده'، مؤثر بودند.

۲- ترکیب هورمونی BAP ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر و NAA ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر، بهترین آمیخته هورمونی از لحاظ تعداد سوخک‌های تولید شده و ریشه‌زایی بود.

۳-محل تشکیل سوخک‌ها در هر ریزنمونه بر تعداد سوخک‌های تولید شده مؤثر بود.

۴- ناحیه زیرین ریزنمونه‌ها، بیشترین تعداد سوخک را در مقایسه با نواحی جانبی و انتهایی تولید کردند.

۵- پیت بهترین آمیخته خاکی برای شرایط برون شیشه‌ای بود.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح مصوب شماره ۱۳٤-۸۲-۲۹-۳۰-۱۲۱ سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی مشترک بین ایستگاه ملی تحقیقات گل و گیاهان زینتی محلات و موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی انجام شد.

۱- Alar ۲- Cycocel ۳- Paclobutrazol ۴- Polarity ۵- Necrosis ۶- Brickell

www.SID.ir

Archive of SID

منابع REFERENCES

۱. آزادی، پ. ۱۳۸۵. موانع استفاده از بیوتکنولوژی در گیاهان زینتی و راهکارهای رفع این موانع. مجموعه مقالات سمپوزیوم ملی "راهکارهای بهبود تولید و توسعه صادرات گل و گیاهان زینتی ایران". محلات. آبان ۱۳۸۵.

۲. تاتاری ورنوسفادرانی، م.، ر. فتوحی قزوینی و ی. حمیداوغلی. ۱۳۸٦. تاثیر نوع سوسن، تنظیم‌کننده رشد و محل تهیه ریزنمونه بر ریزافزایی سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*) و دورگ آسیایی (*Lilium longiflorum* cv. Gironde).

۳. معمار مشرفی، م.، ا. معینی و ا.توسلیان. ۱۳۸۱. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالن استیک اسید و بنزیل‌آمینوپیورین ریزنمونه، موقعیت‌های مختلف فلس و دوره نوری بر کشت بافت سوسن چلچراغ. مجله علوم زراعی ایران. ۲٦۱-۲۵۳: ٤.

4. Abdi, G.h. and M. Khosh-Khui. 2007. Shoot regeneration via direct organogenesis from leaf segments of valerian (*Valeriana officinalis* L.). Int. J. Agr. Res. 2:877-882.
5. Arzate-Fernández, A.M., T. Nakazaki, Y. Okumoto and T. Tanisaka. 1997. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). Plant Cell Rep. 16:836-840.
6. Bacchetta, L., P.C. Remotti, C. Bernardini and F. Saccardo. 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74:37-44.
7. Brickell, C. 1990. The RHS Gardener's Encyclopedia of Plants and Flowers. Dorling Kindersley Publishers Ltd. ISBN 0-86318-386-7.
8. Das, G. and G.R. Rout. 2002. Direct plant regeneration from leaf explants of *Plumbago* species. *Plant* Cell, Tis. Organ Cult. 68: 311- 314.
9. Hajnajjari, H. 1995. Micropropagation. Research Institute of Forests and Rangelands (in Press).
10. Jeong, J.H. 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. Acta Hort. 414:269-276.
11. Kumar, S., M. Kashyap and D.R. Sharma. 2005. *In vitro* regeneration and bulblet growth from lily bulbscale explants as affected by retardants, sucrose and irradiance. Biol. Plant. 49:629-632.
12. Maesato, K., K. Sharada, H. Fukui, T. Hara and K.S. Sarma. 1994. *In vitro* bulblet regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thunb. Effect of plant growth regulators and culture environment. J. Hort. Sci. 69:289-297.
13. Nhut, D.T., B.V. Le, S. Fukai, M. Tanaka and K. Tran Thanh Van. 2001. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regul. 33:59-65.
14. Niimi, Y. 1995. *In vitro* propagation and post *in vitro* establishment of bulblets of *Lilium japanicum* Thumb. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 63:843-852.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Novac F.J. and E. Petro. 1981. Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. Sci. Hort. 14:191-199.
16. Nuth, D.T. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Rep. 17:913-916.
17. Ohkawa, K. 2000. Flower industry in Northeast Asia: Development and introduction of new crops: Acta Hort. 54:125-133.
18. Takayama, S. and M. Misawa. 1982. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Plant Cell Physiol. 23:67-74.
19. Takayama, S. and M. Misawa. 1983. A scheme for mass propagation of *Lilium in vitro*. Sci. Hort. 18:353-362.
20. Van Aartrijk, J. and G.J. Bloom-Barnhoorn. 1981. Growth regulator requirements for adventitious regeneration from *Lilium* bulb-scale *in vitro*, in relation to duartion of bulb storage and cultivar. Sci. Hort. 14:261-268.
21. Van Aartrijk, J., G.J. Bloom-Barnhoorn and P.C.G. van der Linde. 1990. Lilies In P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y.P.S Bajaj (eds.), Handbook of Plant Cell Culture Vol. 5. Collier Macmillan Publishers, London, 535-576.
22. Varshney, A., V. Dhawan and P.S. Srivastava. 2000. A protocole for *in vitro* mass propagation of lily through liquid stationary culture. *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant. 36:383-391.
23. Wawrosch, C., P.R. Malla and B. Kopp. 2001. Clonal propagation of *Lilium nepalense* D.Don, a threatened medicinal plant of Nepal. Plant Cell Rep. 20:285-288.
24. Wickremesinhe, E.R.M., E.J. Holcomb and R.N. Arteca. 1994. A practical method for the production of flowering Easter lilies from callus cultures. Sci. Hort. 60:143-152.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 11 (3): 221-234 (2010)

DIRECT *IN VITRO* BULBLET PRODUCTION IN *LILIUM LONGIFLORUM* CV. 'GIRONDE'

N. MOJTAHEDI, P. KOOBAZ, O. DABIR-ASHRAFI AND A.A. HABASHI[1]

Micropropagtaion of ornamental plants using tissue culture technique, is a new efficient method for propagation of plants. *Lilium* is an ornamental plant, which is highly valuable in international flower markets. Due to Iran's dependency to the importation of *Lilium* bulbs, it is highly desirable to propagate this plant efficiently in the country. One of the most effective techniques for propagation of *Lilium* is *in vitro* direct bulblet production using scale explants. To find the best plant growth regulators concentrations for direct bulblet production of *Lilium longiflorum* cv. 'Gironde', four concentrations of BAP (0, 0.03, 0.3, 3 mg l^{-1}) in combination with three concentrations of NAA (0, 0.03, 0.3 mg l^{-1}) were evaluated. Scale explants placed on MS basal medium supplemented with 60 g l^{-1} sucrose and 7 g l^{-1} agar after surface sterilization. The substrate for acclimatization and growth of *in vitro* bulblets were also studied. The experiment conducted in factorial based on completely randomized design (CRD) and statistical analysis was made using SAS software and mean comparison was carried out using Duncan's multiple range test. Bulblet production parameters including number of scales per bulblet, bulblet length, weight and diameter, rooting percentage, and position of bulblet formation in each explant (basal, lateral and distal) were analyzed. The results showed that BAP and NAA had a significant effect on all measured parameters. The combination of 0.03 mg l^{-1} BAP with 0.3 mg l^{-1} NAA produced the most bulblet number and the highest rooting percentage. Basal part of the explants, produced the most bulblets in comparison with lateral and distal parts. Peat was the best substrate (soil mixture) for *in vitro* bulblet's growth and development for *Lilium longiflorum* cv. 'Gironde'.

Keywords: BAP, bulblet production, Direct *in vitro, Lilium*, NAA.

1. Instructor, Assistant Researcher (pkoobaz@abrii.ac.ir), Research Assistant and Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Centre, Karaj, I.R. Iran, respectively.

www.SID.ir