Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 4, Winter 2021 (809-821)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.278911.1688

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۹ (ص ۸۲۱-۸۰۹)

تأثیر نور، غلظت ساکارز و موقعیت فلس جفتی بر ریزازدیادی گیاه آماریلیس (*Hippeastrum×johnsonii*)

سیده مهدیه خرازی[1*]، علی تهرانی‌فر[2]، احمد شریفی[1] و عبدالرضا باقری[2]
۱. استادیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۲. استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۷)

چکیده

آماریلیس یکی از گیاهان سوخدار زینتی است که تکثیر آن به‌صورت تجاری به کندی صورت می‌گیرد. کاربرد تکنیک‌های کشت بافت می‌تواند راهکاری مناسب جهت افزایش ضریب تکثیر این گیاه زینتی باشد. این پژوهش در قالب دو آزمایش جداگانه انجام شد. در آزمایش اول اثر شرایط نوری و موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری بر میزان باززایی فلس‌های جفتی آماریلیس مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش دوم اثر غلظت‌های مختلف ساکارز (۳۰، ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر) و اثر موقعیت فلس جفتی در سوخ مادری بررسی شد. از محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA استفاده شد. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاًتصادفی با پنج تکرار انجام شد. نتایج نشان داد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در مقایسه با شرایط تاریکی، تعداد سوخک بیشتری تولید گردید. همچنین از لحاظ قطر سوخک باززایی‌شده، شرایط روشنایی نسبت به شرایط تاریکی برتری داشت. یافته‌های پژوهش حاضر برتری فلس‌های جفتی لایه‌های خارجی سوخ را در مقایسه با لایه‌های داخلی نشان داد. سوخک‌های باززاشده از فلس‌های جفتی گروه یک قطورتر بودند و وزن خشک بیشتری را به خود اختصاص دادند. کاربرد ساکارز با غلظت ۶۰ گرم در لیتر، منجر به تولید سوخک‌هایی با بیشترین میزان وزن خشک گردید. با افزایش غلظت ساکارز از ۶۰ به ۹۰ گرم در لیتر، قطر سوخک باززاشده به طور معنی داری کاهش یافت. به طورکلی کاربرد محیط‌کشت حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز، فلس‌های جفتی گروه یک و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی جهت افزایش ضریب تکثیر آماریلیس توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ساکارز، شرایط نوری، قطر سوخک، موقعیت فلس جفتی.

Effect of light condition, sucrose concentration and position of twin scale on maternal bulb on the propagation of twin scale explants of amaryllis (*Hippeastrum* × *johnsonii*) under *in vitro* condition

Mahdiyeh Kharrazi[1*], Ali Tehranifar[2], Ahmad Sharifi[1] and Abdolreza Bagheri[2]
1. Assistant Professor, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Khorasan Razavi, Mashhad, Iran
2. Professor, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran
(Received: Aug. 11, 2019 - Accepted: Sep. 29, 2019)

ABSTRACT

Amaryllis is one of the ornamental bulbous plants that its proliferation is commercially slow. Application of tissue culture techniques can be a suitable way to increase the propagation rate of this ornamental plant. This study was conducted in two separate experiments. In the first experiment, the effect of light condition and position of twin scales in the mother bulb was evaluated on the regeneration of Amaryllis twin scales. In the second experiment, the effects of different concentrations of sucrose (30, 60 and 90 g/l) and the position of twin scales in the mother bulb investigated. MS medium containing 0.5 mg/l BA+0.1 mg/l NAA was used. Experiments were carried out in a factorial arrangement with five replications in a completely randomized design. Results showed that 16-hour light condition lead to production of more bulblets than dark condition. In terms of bulblet diameter, the brightness conditions were superior to the dark condition. The findings of this study showed the superiority of the outermost twin scales compared to innermost twin scales. Bulblets regenerated from twin scale group 1 were thicker than the other treatments and their dry weight was also higher. Application of sucrose at a concentration of 60 g /l to the culture medium resulted in the production of bulblets with the highest dry weight. By increasing the concentration of sucrose from 60 to 90 g/ l, there was a significant decrease in the regenerated bulblet diameter. Generally, application of medium containing 60 g/l sucrose, twin scales group 1 and 16-hour light conditions is recommended to increase the multiplication rate of Amaryllis.

Keywords: Bulblet diameter, light conditions, position of twin scale, sucrose.

* Corresponding author E-mail: ma_kh230@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه آماریلیس (*Hippeastrum* × *johnsonii*) یکی از گیاهان سوخدار زینتی از تیره آماریلیداسه (Amaryllidaceae) است که به عنوان گیاه گلدانی، فضای سبز و گل شاخه بریده پرورش داده می‌شود (Trinklein, 2009). بر اساس گزارش اداره بازرگانی سوئد، در سال ۲۰۰۹، جزو ۱۰ گل برتر شاخه بریده دنیا مطرح گردید (The Swedish chambers of commerce, 2011). همچنین در همان سال با فروش ۳۶ میلیون پوند در هلند، رتبه نهم را در بین گل‌های شاخه بریده هلند به خود اختصاص داد و بر اساس طبقه بندی اتحادیه اروپا، به عنوان هشتمین گل شاخه بریده مهم مطرح گردید (Rikken, 2010). لذا با توجه به ارزش اقتصادی بالای این گیاه زینتی، برطرف کردن موانع و مشکلات تکثیر این گیاه زینتی حائز اهمیت می‌باشد.

دوره رشد طولانی مورد نیاز جهت تولید سوخ‌های قابل فروش، یکی از مشکلات اصلی تولید این گیاه زینتی می‌باشد (De Bruyn, 1997). بنابراین بهبود روش‌های تکثیر سنتی و کاربرد روش‌های نوین نظیر کشت بافت، راهکاری مناسب جهت کوتاه کردن دوره رشدی این گیاه زینتی می‌باشد. برای افزایش رویشی گیاهان سوخدار، ریزازدیادی به عنوان موثرترین روش استفاده شده است (Azimzadeh *et al.*, 2018). با کاربرد تکنیک کشت بافت (Tissue culture)، علاوه بر صرف زمان و هزینه کمتر، برخی مشکلات تکثیر سنتی از قبیل آلودگی‌ها و ضریب تکثیر پایین را می‌توان برطرف کرد. طبق برخی از گزارش‌ها با استفاده از این روش‌ها ازدیاد آماریلیس را می‌توان به میزان زیادی افزایش داد (Seabrook & Cumming, 1977؛ Witomska *et al.*, 2008). بر اساس گزارش Witomska *et al*. (2008) تنها از یک ریزنمونه گلپایه (Scape) گیاه آماریلیس، می‌توان ۱۱۴ عدد سوخک در شرایط درون‌شیشه‌ای (*In vitro*) ایجاد کرد. به عبارتی از هر ۲ میلی‌متر ریزنمونه گلپایه نزدیک به ۶ عدد سوخک تولید می‌گردد. جهت تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای از ریزنمونه فلس جفتی (Twin scale) نیز می‌توان استفاده نمود. در روش فلس جفتی، پیاز مادری با استفاده از چندین برش عمودی، به قطعات مساوی تقسیم می‌گردد. سپس قطعات برش داده‌شده به نحوی تقسیم می‌شوند که هر قطعه حاوی دو فلس باشد، به طوریکه این دو فلس از طریق بخشی از صفحه پایگاهی (Basal plate) به یکدیگر متصل باشند (Rees & Hanks, 1980).

میزان باززایی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد (Sharifi *et al.*, 2010; Asadi *et al.*, 2018). شرایط نوری به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر میزان باززایی ریزنمونه‌های گیاهان سوخدار در شرایط درون شیشه‌ای ذکر شده است. مطالعات نشان می‌دهد که سوخک‌های حاصل از فلس جفتی که در شرایط نوری تولید شوند، در مقایسه با شرایط تاریکی، هنگام انتقال به شرایط طبیعی، دچار استرس نوری نمی‌گردند و تجمع ماده خشک در آنها سریع‌تر صورت می‌گیرد که علت آن وجود برگ‌های سبز فتوسنتزکننده می‌باشد (Stancato *et al*., 1995؛ Stancato & Mazzafera, 1995). یافته‌های پژوهش Stancato *et al.* (1995)، نشان داد که وزن خشک و سطح برگ پیازچه‌های تولید شده در شرایط تاریکی مداوم، نسبت به پیازچه‌های رشد یافته در شرایط روشنایی و شرایط تاریکی- روشنایی کمتر می‌باشد. همچنین رشد پیازهای حاصل از شرایط تاریکی، در زمان انتقال به مزرعه کندتر است که علت آن رقابت شدید بین برگ‌ها و ریشه‌ها برای جذب مواد غذایی و آسیمیلات هاست (Stancato & Mazzafera, 1995). نتایج تحقیقات Hosseini *et al*. (2013) بر روی گیاه نرگس (از تیره آماریلیداسه) نیز نشان داد که هیچگونه سوخکی از ریزنمونه‌های کشت شده تحت شرایط تاریکی باززایی نگردید.

از سوی دیگر، کربوهیدرات‌ها به عنوان منبع تأمین‌کننده انرژی و همچنین به عنوان عامل حفظ پتانسیل اسمزی در شرایط درون شیشه‌ای عمل می‌کنند. علاوه بر این رشد و آغازش ریشه از جمله مراحلی هستند که به انرژی زیادی نیازمند است و با صرف سوبسترای متابولیکی که عمدتا کربوهیدرات‌ها می‌باشند، رخ می‌دهد (Bagheri & Safari, 1997).

www.SID.ir

Archive of SID

اصولا در هر نوع محیط کشت قند جزء بسیار مهمی می‌باشد و از آنجا که عموما شرایط رشد برای فتوسنتز کافی نیست و یا اصولاً به علت تاریکی فتوسنتز انجام نمی‌شود، بنابراین اضافه نمودن قند به محیط کشت ضروری است. بافت‌های سبز در شرایط درون شیشه‌ای به قدر کافی اتوتروف نیستند و غلظت دی اکسید کربن در شرایط درون شیشه‌ای می‌تواند عامل محدود کننده باشد و در عمل اضافه نمودن دی اکسید کربن خیلی مشکل و گران است (Bagheri & Safari, 1997). در بین انواع مختلف کربوهیدرات‌ها، ساکارز به عنوان منبع کربن مناسبی در شرایط درون شیشه‌ای شناخته شده است. زیرا رایج‌ترین منبع کربوهیدرات شناخته شده در شیره پرورده بسیاری از گیاهان، ساکارز می‌باشد. علاوه براین ساکارز به راحتی قابل جابجا شدن می‌باشد و باعث حفظ پتانسیل اسمزی می‌گردد و در برابر تخریب آنزیمی مقاوم می‌باشد (Fatima *et al.*, 2015).

گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر مثبت افزایش غلظت ساکارز بر تعداد سوخک باززاشده در گونه‌های پیازی متفاوتی ارائه شده است (Hosseini *et al*., 2013; Lee *et al.*, 2004). طی پژوهش انجام شده توسط Sultana *et al.* (2010)، تأثیر غلظت‌های متفاوت ساکارز بر میزان باززایی ریزنمونه‌های فلس جفتی آماریلیس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج پژوهش آنها نشان داد که افزایش غلظت ساکارز تا ۹۰ گرم در لیتر باعث افزایش درصد و سرعت باززایی گردید. بیشترین وزن و تعداد سوخک باززاشده نیز در غلظت ۹۰ گرم در لیتر ساکارز گزارش شد. در پژوهش انجام شده توسط Mojtahedi & Azadi (2008) بر روی دو رقم لیلیوم، مشخص گردید که غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز، تأثیر مطلوبی بر پارامترهای مورد ارزیابی داشت و با افزایش غلظت ساکارز تا ۶۰ گرم در لیتر، وزن، طول و قطر سوخک باززاشده افزایش یافت، ولی غلظت‌های بالاتر (۹۰ گرم در لیتر) باعث کاهش شاخص‌های رشدی گردید.

با توجه به وجود گزارش های متفاوت در رابطه با تأثیر نور و غلظت بهینه ساکارز در محیط کشت بر باززایی سوخک‌های کشت بافتی، نیاز به بهینه سازی این عوامل جهت افزایش بازده تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. لذا این آزمایش با هدف بررسی اثر نور، غلظت‌های متفاوت ساکارز بر میزان باززایی ریزنمونه‌های فلسی تهیه‌شده از لایه‌های مختلف پیاز آماریلیس صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب دو آزمایش جداگانه، در آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی به شرح ذیل انجام شد. سوخ‌های آماریلیس (*Hippeastrum* × *johnsonii*) بعد از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه از گلخانه‌ای در شهرستان کاشمر جمع‌آوری گردیدند. پس از انتقال سوخ‌ها به آزمایشگاه، ابتدا فلس‌های آسیب دیده و آلوده حذف گردیدند و سپس پیازها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع‌شوینده رایج شستشو داده شدند. پس از این مرحله، از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه برای از بین‌بردن آلودگی‌های باکتریایی استفاده شد. سپس برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی از محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار ۳ مرتبه در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند و جهت انجام آزمایشات ذیل مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش اول

برای انجام این آزمایش پس از مرحله شستشو، سوخ‌ها در داخل پتری دیش روی کاغذ صافی استریل شده، قرار گرفتند. فلس‌های خارجی پیازها که در مواجه شدن با ماده گندزدا آسیب دیده بودند جدا و پیازها با استفاده از اسکالپل به صورت شعاعی به ۱۲ قطعه مساوی برش داده شدند، به‌طوری‌که هر قطعه دارای بخشی از صفحه پایگاهی باشد. سپس به منظور بررسی اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری، قطعات برش خورده به ۴ نمونه فلس جفتی تقسیم و گروه بندی شدند، به‌طوری‌که در گروه یک، خارجی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی و در گروه چهار، داخلی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی قرار گرفتند. جهت کشت ریزنمونه‌ها، از محیط‌کشت جامد MS حاوی

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۳ درصد ساکارز (ساخت شرکت مرک آلمان)، ۸ گرم در لیتر آگار (ساخت شرکت مرک آلمان)، pH=۵/۷ استفاده شد. پس از توزیع، محیط کشت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اُتوکلاو گردیدند. پس از کشت، نیمی از ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی و نیمی دیگر به شرایط تاریکی مطلق، دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در پایان آزمایش، عکس‌العمل ریزنمونه‌ها (ارتفاع گیاهچه باززاشده، تعداد برگ تولیدشده، تعداد و قطر سوخک باززاشده، تعداد و طول ریشه تولیدی) مورد ارزیابی قرارگرفت. این آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل (۲×۴) با ۲ عامل شامل نوع ریزنمونه (۴ سطح) و شرایط روشنایی یا تاریکی (۲ سطح) با ۴ تکرار، در قالب طرح کاملاًتصادفی انجام شد.

آزمایش دوم

غلظت ساکارز یکی از فاکتورهای مؤثر در افزایش قطر سوخک‌های گیاهان سوخدار در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. بنابراین در این آزمایش به بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و همچنین اثر متقابل این عامل و موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر باززایی فلس‌های گیاه آماریلیس در شرایط کشت درون شیشه‌ای پرداخته شده است. روش تهیه ریزنمونه ها و محیط کشت مورد استفاده همانند آزمایش قبل بود، تنها با این تفاوت که غلظت‌های متفاوت ساکارز (۳، ۶ و یا ۹ درصد) در این آزمایش نیز مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس) در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در پایان آزمایش، عکس‌العمل ریزنمونه‌ها (همانند آزمایش قبل) مورد ارزیابی قرارگرفت. این آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل (۳×۴) با ۲ عامل شامل نوع ریزنمونه (۴ سطح) و غلظت ساکارز (۳ سطح) با ۵ تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Jump 8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

آزمایش اول

اثر شرایط روشنایی و یا تاریکی بر صفات مورد ارزیابی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد شرایط روشنایی و یا تاریکی تأثیر معنی‌داری بر تعداد و قطر سوخک‌های باززاشده داشت ($P\leq$۰/۰۵). ریزنمونه‌های رشد یافته در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در مقایسه با شرایط تاریکی، تعداد سوخک بیشتری تولید نمودند. همچنین از لحاظ قطر سوخک باززاشده، شرایط روشنایی نسبت به شرایط تاریکی برتری داشت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک سوخک‌های باززاشده در شرایط روشنایی و یا تاریکی بیانگر تأثیر معنی‌دار این عامل بر وزن خشک سوخک‌ها بود ($P\leq$۰/۰۱). به‌طوری‌که وزن خشک سوخک‌های تولید شده در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، ۱/۵ برابر بیش از این میزان در شرایط تاریکی بود (جدول ۱).

تعداد و طول ریشه تولیدشده نیز تحت تأثیر شرایط روشنایی و یا تاریکی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سوخک‌های رشد یافته در شرایط روشنایی ۱۶ ساعته، تعداد ریشه کمتر و کوتاه‌تری را تولید نمودند و از این لحاظ تفاوت معنی‌داری با شرایط تاریکی داشتند. تعداد و طول ریشه تولید شده تحت شرایط تاریکی، به ترتیب به میزان ۸۷٪ و ۶۵٪ نسبت به شرایط روشنایی بیشتر بود (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین اثر شرایط روشنایی و یا تاریکی بر صفات مورد ارزیابی در کشت درون شیشه‌ای آماریلیس

Table 1. Mean comparison effect of light or darkness conditions on evaluated traits on *in vitro* culture of amaryllis

Light condition	Number of regenerated bulblet	Diameter of regenerated bulblet (cm)	Dry weight of regenerated bulblet	Root number	Root length (cm)
16-hour brightness conditions	1.38 a	0.84 a	0.025 a	1.81 b	0.91 b
Absolute dark conditions	1.00 b	0.75 b	0.016 b	3.40 a	1.50 a

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different at probability level of 5% based on LSD test.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکیل سوخک از ریزنمونه فلس جفتی در گیاهان سوخدار مختلف، در شرایط روشنایی (Jacobs *et al.*, 1992) و تاریکی (Colque *et al.*, 2002) گزارش شده است که نشان می‌دهد تناوب نوری مطلوب به جنس گیاه بستگی دارد. در بسیاری از گیاهان پیازی، اعمال یک دوره تاریکی در طی شبانه‌روز (۸ ساعت تاریکی)، تشکیل سوخک را تحریک می‌نماید (Van Aartrijk *et al.*, 1986). نتایج پژوهش‌ها روی گیاهان جنس سیرتانتوس (*Cyrtanthus*) (از تیره آماریلیداسه) و لیلیوم نشان می‌دهد که در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، تعداد سوخک بیشتری از ریزنمونه‌های فلس جفتی تشکیل می‌گردد (Morán *et al.*, 2003; Varshney *et al.*, 2000). مطالعات Rice *et al.* (2011) نیز نشان داد که اعمال یک دوره تاریکی ۸ ساعته در طی شبانه‌روز، منجر به افزایش القا و تولید سوخک در ریزنمونه‌های فلس جفتی در گیاه برانسویجیا آندولاتا (*Brunsvigia undulata*) (از تیره آماریلیداسه) گردید. مطالعات انجام‌شده بر روی ریزازدیادی گیاه نرگس نشان‌دهنده تأثیر نامطلوب شرایط تاریکی مطلق بر تولید سوخک در شرایط درون‌شیشه‌ای بود، به طوری‌که در این شرایط هیچگونه سوخکی تشکیل نگردید. این درحالی است که نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که شرایط تاریکی مطلق بازدارنده تولید سوخک نمی‌باشد، ولی اعمال چنین شرایطی تأثیر منفی روی شاخص‌های کیفی مورد ارزیابی دارد و به علت عدم حضور نور، سوخک‌های تولید شده سفید رنگ و فاقد کلروفیل می‌باشند.

اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر صفات مورد ارزیابی

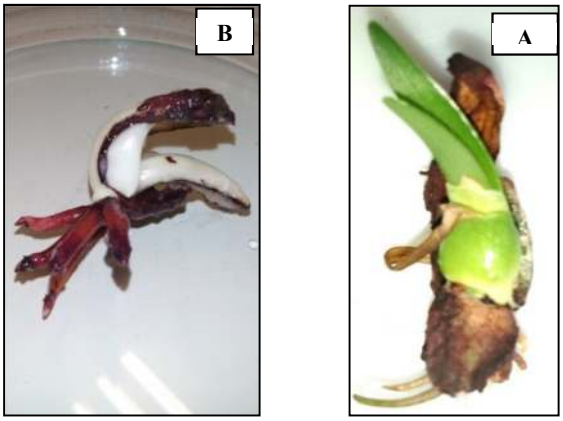
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده گروه‌های مختلف فلس جفتی تأثیر معنی‌داری بر قطر سوخک باززاشده داشت ($P\leq ۰/۰۱$). سوخک‌های باززاشده از فلس‌های جفتی گروه یک نسبت به سایر تیمارها قطورتر بودند، با این حال تفاوت معنی‌داری از این لحاظ با فلس جفتی گروه دو نداشتند. از سوی دیگر، قطر سوخک‌های باززاشده از لایه‌های داخلی‌تر پیاز (فلس جفتی گروه چهار)، نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. علاوه بر قطر سوخک، وزن تر و خشک سوخک نیز تحت تأثیر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری قرار گرفت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر و خشک سوخک‌های باززاشده نشان داد که بیشترین میزان وزن تر و خشک سوخک‌های باززاشده، در ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه یک و کمترین میزان این صفات در ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه چهار مشاهده شد. به عبارت دیگر، میزان وزن تر و خشک سوخک‌ها در ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه یک، بیش از دو برابر میزان به‌دست‌آمده در ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه چهار بود. از لحاظ تعداد ریشه تولیدشده نیز اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری معنی‌دار بود ($P\leq ۰/۰۵$). پتانسیل تولید ریشه در فلس جفتی گروه یک نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشتر بود، با این حال تفاوت معنی‌داری از این لحاظ بین فلس‌های جفتی گروه یک تا سه مشاهده نشد. کمترین تعداد ریشه تولیدشده نیز در ریزنمونه‌های فلس جفتی گروه چهار به‌دست آمد (جدول ۲).

تفاوت مورفولوژیکی بین فلس‌های بیرونی، میانی و داخلی پیاز نشان می‌دهد که فلس‌های جفتی تهیه شده از این بخش‌ها می‌توانند پاسخ متفاوتی را ایجاد نمایند (Rice *et al.*, 2011). تحقیقات انجام شده بر روی لیلیوم و سوسن چلچراغ نشان می‌دهد که فلس‌های تهیه شده از لایه‌های خارجی و میانی پیاز دارای قابلیت باززایی بیشتری می‌باشند و سوخک‌های قطورتری در مقایسه با لایه‌های داخلی‌تر پیاز تولید می‌کنند. آنالیز محتوای درونی کربوهیدرات فلس‌ها بیانگر بالاتر بودن محتوای کربوهیدرات لایه‌های فلسی خارجی و میانی در مقایسه با لایه‌های داخلی‌تر پیاز می‌باشد (Park, 1994; Padasht Dehkaei *et al.*, 2006).

Pierik & Ippel (1977) عنوان نمودند که افزایش اندازه ریزنمونه (چه از لحاظ طولی و چه از لحاظ عرضی)، منجر به افزایش میزان باززایی در ریزنمونه‌های فلسی گیاه نرین (*Nerine*) (از تیره آماریلیداسه) گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. اثر شرایط روشنایی و یا تاریکی بر باززایی ریزنمونه فلس جفتی آماریلیس (A: شرایط ۱۶ ساعت روشنایی؛ B: شرایط تاریکی)
Figure 1. Effect of light or darkness conditions on the regeneration of twin scale explants of amaryllis (A: 16-hour brightness conditions; B: dark conditions)

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر صفات مورد ارزیابی در کشت درون شیشه‌ای آماریلیس
Table 2. Mean comparison effect of scale position in the mother bulb on evaluated traits on *in vitro* culture of amaryllis

Scale position	Diameter of regenerated bulblet (cm)	FW of regenerated bulblet (g)	DW of regenerated bulblet (g)	Root number
Twin scale Group 1	0.92 a	0.29 a	0.027 a	4.00 a
Twin scale Group 2	0.86 a	0.23 ab	0.024 ab	2.92 ab
Twin scale Group 3	0.74 b	0.18 b	0.020 b	2.38 ab
Twin scale Group 4	0.65 b	0.12 b	0.012 c	1.13 b

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.
Means followed by the same letter within each column are not significantly different at probability level of 5% based on LSD test.

با توجه به این‌که لایه‌های فلسی خارجی پیاز نسبت به لایه‌های داخلی‌تر، سطح مقطع بیشتری را به خود اختصاص می‌دهند، حاوی ذخایر غذایی بیشتری نیز می‌باشند که وجود این ذخایر غذایی به افزایش قابلیت باززایی و تولید سوخک‌های قوی‌تر کمک می‌نماید.

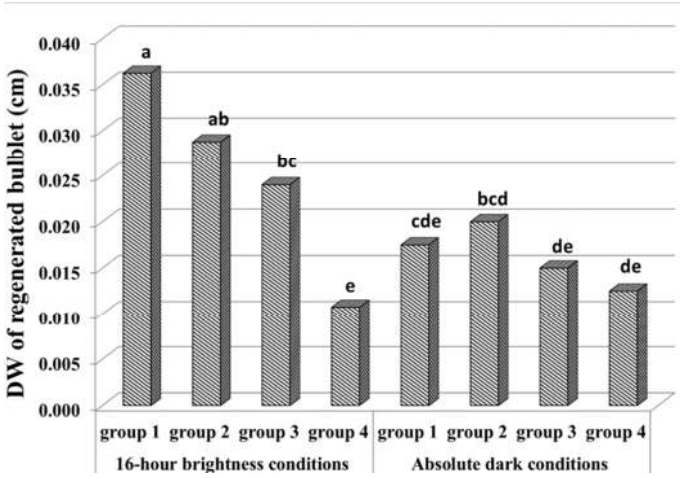
اثر متقابل شرایط روشنایی و یا تاریکی و موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر وزن خشک سوخک باززاشده

نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که اثر متقابل شرایط روشنایی و یا تاریکی و موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری تنها بر وزن خشک سوخک باززاشده معنی‌دار بود ($P\leq ۰/۰۵$). بررسی مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که تحت شرایط روشنایی، کاربرد فلس جفتی گروه یک به عنوان ریزنمونه، منجر به تولید سوخک‌هایی با وزن خشک بیشتر در مقایسه با سایر تیمارها گردید. همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد در فلس جفتی گروه یک، اعمال شرایط روشنایی منجر به افزایش دو برابری در میزان وزن خشک سوخک‌های تولیدی در مقایسه با شرایط تاریکی گردید. از سوی دیگر، کمترین وزن خشک به‌دست‌آمده به فلس جفتی گروه چهار و شرایط روشنایی اختصاص داشت.

در گزارش Stancato & Mazzafera (1995) برتری شرایط روشنایی نسبت به شرایط تاریکی جهت تکثیر پیاز آماریلیس بیان گردید. سوخک‌های تولید شده در شرایط روشنایی نسبت به شرایط تاریکی وزن خشک بیشتری را به خود اختصاص دادند. نتایج پژوهش Park (1994) بر روی تکثیر رقم های مختلف لیلیوم نشان داد که در تمامی رقم های مورد بررسی، سوخک‌های تولید شده از لایه‌های خارجی و میانی پیاز، در مقایسه با لایه‌های داخلی پیاز، وزن بیشتری را به‌خود اختصاص دادند. با این‌حال، در تحقیق دیگری که روی گیاه لیلیوم رقم گلریا (Gelria) انجام شد، تنها برتری فلس‌های تهیه‌شده از لایه‌های خارجی پیاز، جهت تکثیر گیاه لیلیوم عنوان گردید (YongKweon & ByungWoon, 2006). در پژوهش حاضر نیز لایه‌های فلسی خارجی پیاز تحت شرایط روشنایی، پاسخ رشدی مناسب‌تری را از خود نشان دادند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل شرایط نوری و موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر وزن خشک سوخک باززاشده آماریلیس
Figure 2. Mean comparison interaction effect of sucrose concentration and scale position in the mother bulb on dry wight of regenerated bulblet of amaryllis.

آزمایش دوم

اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر صفات مورد ارزیابی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت ساکارز بر تمامی صفات مورد ارزیابی به‌جز تعداد سوخک باززاشده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مندرج در شکل ۳، تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز را بر قطر سوخک باززاشده آماریلیس نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت ساکارز تا ۶۰ گرم در لیتر، قطر سوخک باززاشده افزایش یافت، ولی با این حال تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر مشاهده نشد ($P\leq$۰/۰۵). از سوی دیگر با افزایش غلظت ساکارز از ۶۰ به ۹۰ گرم در لیتر، کاهش ۱۴ درصدی در قطر سوخک باززاشده مشاهده شد. تحقیقات نشان می‌دهد با وجود آنکه حضور مقدار مشخصی ساکارز برای باززایی ریزنمونه‌های فلس جفتی مورد نیاز می‌باشد، ولی غلظت‌های بالای ساکارز تأثیر منفی بر پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها دارد (De Bruyn *et al.*, 1992).

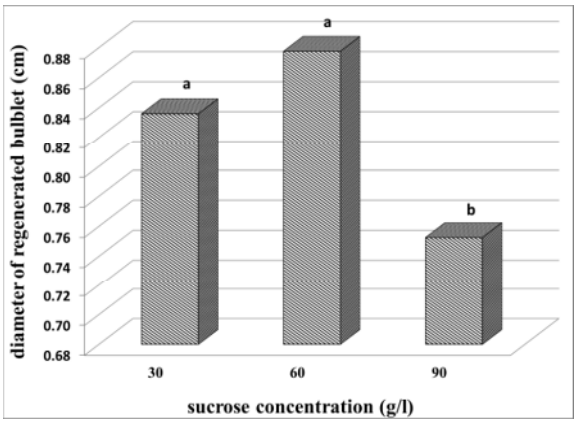
Lee *et al.* (2004) عنوان نمودند کاربرد غلظت‌های بالاتر از ۹۰ گرم در لیتر ساکارز، به شدت از تشکیل سوخک در ریزنمونه‌های فلس جفتی گیاه نرین (ازخانواده آماریلیداسه) جلوگیری می‌نماید. در گزارش Ming *et al.* (2012) که بر روی کشت درون شیشه‌ای لیلیوم انجام شد، سوخک‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز، بیشترین وزن سوخک تولیدی را به خود اختصاص دادند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر افزایش غلظت ساکارز بر تعداد سوخک باززاشده در گونه‌های پیازی متفاوتی ارائه شده است (Hosseini *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2004). با این حال نتایج پژوهش حاضر حاکی از عدم تأثیر معنی‌دار غلظت ساکارز بر تعداد سوخک باززاشده بود. نتایج پژوهش Staikidou *et al.* (2004) بر روی گیاه گالانتوس (از تیره آماریلیداسه) نیز نشان داد دو برابر نمودن غلظت ساکارز تأثیر اندکی بر افزایش رشد سوخک‌ها دارد.

روند تغییرات میزان وزن تر و خشک سوخک‌های باززاشده در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج مندرج در این شکل نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ساکارز تا ۶۰ گرم در لیتر، میزان وزن تر و خشک سوخک‌های باززاشده افزایش یافت و پس از آن با افزایش غلظت تا ۹۰ گرم در لیتر، روند کاهشی از خود نشان داد. بیشترین و کمترین میزان این صفات به ترتیب در تیمارهای ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. در پژوهش انجام شده توسط Ming *et al.* (2012) بر روی گیاه لیلیوم، مشخص گردید که بیشترین وزن سوخک‌های تولیدی در محیط کشت حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز حاصل گردید.

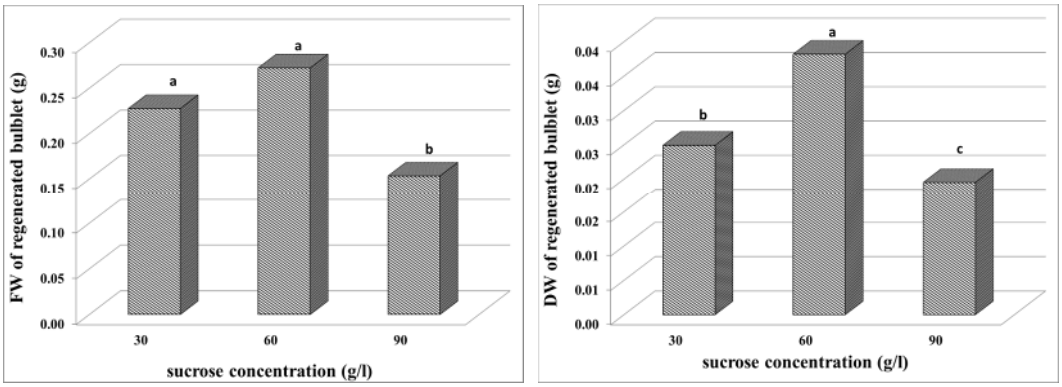
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر غلظت ساکارز بر قطر سوخک باززاشده آماریلیس

Figure 3. Mean comparison effect of sucrose concentration on regenerated bulblet diameter of amaryllis



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر غلظت ساکارز بر وزن تر و خشک سوخک باززاشده آماریلیس

Figure 4. Mean comparison effect of sucrose concentration on bulblet FW and DW of amaryllis

طبق داده‌های به‌دست‌آمده بین غلظت‌های مختلف ساکارز، از نظر تعداد و طول ریشه تولید شده تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P\leq ۰/۰۱$). افزایش غلظت ساکارز تا ۶۰ گرم در لیتر منجر به افزایش تعداد ریشه تولیدی گردید، ولی ریشه‌های تولید شده در غلظت ۶۰ گرم در لیتر نسبت به غلظت ۳۰ گرم در لیتر، کوتاه‌تر بودند، ولی با این حال تفاوت معنی‌داری از لحاظ طول و تعداد ریشه تولیدی بین سطوح ۳۰ و ۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده نشد ($P\leq ۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان‌دهنده تأثیر نامطلوب غلظت ۹۰ گرم در لیتر ساکارز بر تعداد و طول ریشه تولیدی بود، به‌طوری‌که کمترین میزان این صفات در این غلظت مشاهده گردید (شکل ۵).

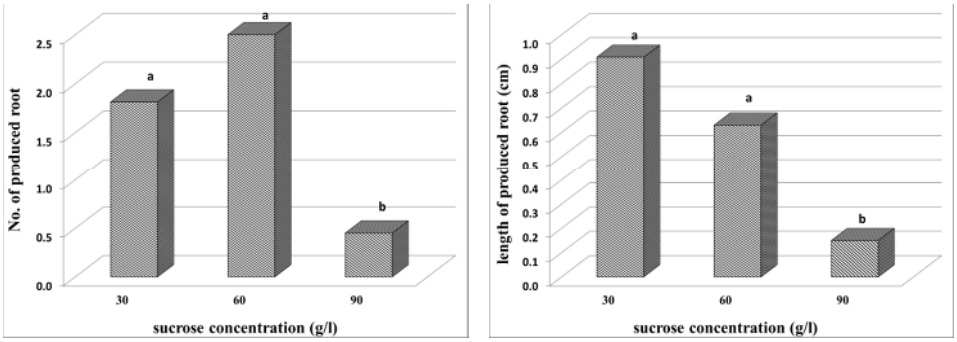
مطالعات Chow *et al.* (1992) نشان داد که میزان ریشه‌زایی سوخک‌های نرگس (از تیره آماریلیداسه) تحت تأثیر غلظت ساکارز در محیط کشت قرار نمی‌گیرد. این در حالی است که Chamani *et al.* (2009) گزارش نمودند که افزایش غلظت ساکارز از ۳۰ به ۹۰ گرم در لیتر، منجر به کاهش تعداد و طول ریشه تولیدی در سوخک‌های نرگس گردید. در پژوهش دیگری که بر روی گیاه گالانتوس (از تیره آماریلیداسه) صورت گرفت، مشخص گردید که غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر میزان ریشه‌زایی سوخک‌های کشت بافتی ندارد (Tipirtamaz, 2003). مغایر بودن نتایج پژوهش حاضر از لحاظ پاسخ ریشه‌زایی با نتایج پژوهش Chow *et al.* (1992) و Tipirtamaz (2003)، احتمالاً به‌دلیل متفاوت‌بودن پاسخ گونه‌های گیاهی به غلظت‌های مختلف ساکارز می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

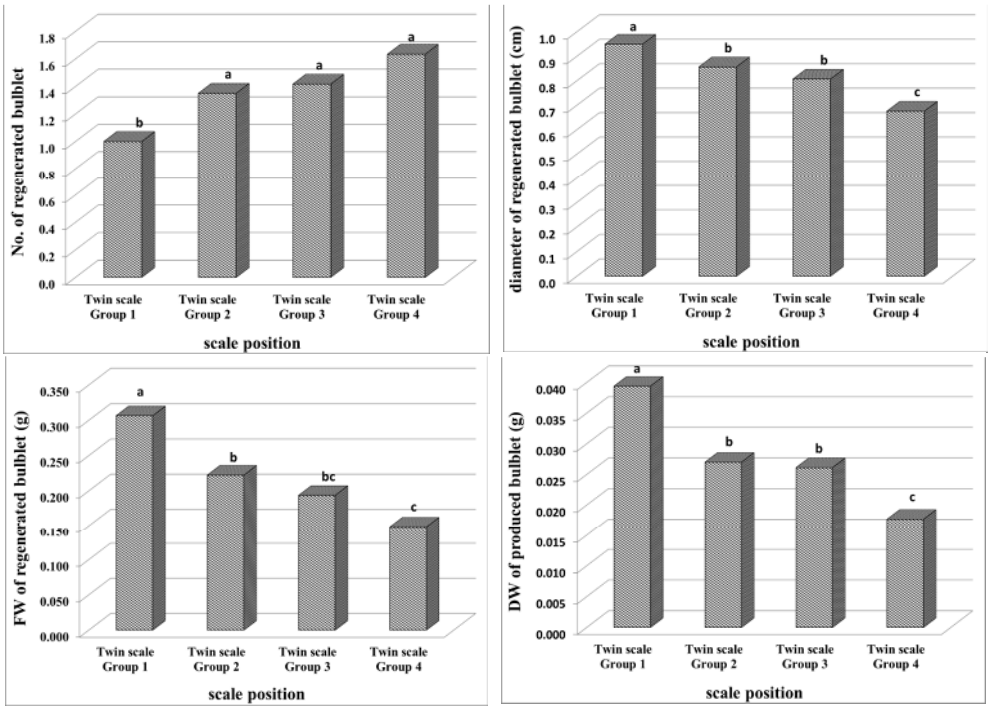
اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر صفات مورد ارزیابی

نتایج نشان داد که موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری تأثیر معنی‌داری بر تعداد سوخک باززاشده داشت (P≤۰/۰۱). لایه‌های خارجی‌تر پیاز (فلس جفتی گروه یک) نسبت به لایه‌های داخلی‌تر پیاز (فلس جفتی گروه ۴) تعداد سوخک کمتری را تولید نمودند. بدین صورت که بیشترین تعداد سوخک باززاشده در فلس جفتی گروه چهار مشاهده شد ولی با این حال تفاوت معنی‌داری از این لحاظ بین فلس‌های جفتی گروه ۲ تا ۴ مشاهده نشد (P≤۰/۰۵). همچنین کمترین تعداد سوخک باززاشده نیز متعلق به فلس جفتی گروه یک بود. علاوه بر تعداد سوخک باززاشده، قطر سوخک نیز تحت تأثیر موقعیت فلس جفتی قرار گرفت. در فلس جفتی گروه یک، شاهد بیشترین میزان و در فلس جفتی گروه چهار شاهد کمترین میزان قطر سوخک می‌باشیم. بین فلس جفتی گروه ۲ و ۳ از این لحاظ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P≤۰/۰۵). به نظر می‌رسد که یک رابطه همبستگی منفی بین صفات تعداد و قطر سوخک وجود دارد. بدین ترتیب که در فلس‌های جفتی گروه یک تعداد سوخک کمتر و با قطر بیشتر و در فلس‌های جفتی گروه چهار، تعداد پیاز بیشتر و با قطر کمتر ایجاد گردید (شکل ۶).



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر غلظت ساکارز بر طول و تعداد ریشه تولید شده آماریلیس

Figure 5. Mean comparison effect of sucrose concentration on length and number of produced roots of amaryllis



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر تعداد، قطر، وزن تر و خشک سوخک باززاشده آماریلیس

Figure 6. Mean comparison effect of scale position in the mother bulb on the number, diameter, FW and DW of regenerated bulblet of amaryllis

www.SID.ir

Archive of SID

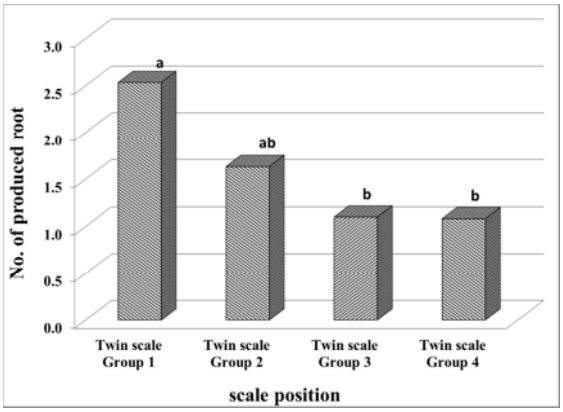
داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری میزان وزن تر و خشک سوخک‌های باززاشده، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین لایه‌های مختلف فلس جفتی بود (P≤۰/۰۱). به‌طوری‌که بیشترین میانگین وزن تر و خشک سوخک‌های باززاشده در فلس جفتی گروه یک و کمترین میزان آنها در فلس جفتی گروه چهار حاصل شد. بررسی میزان وزن تر و خشک سوخک‌های باززاشده نشان‌دهنده افزایش دو برابری میزان وزن سوخک‌های تولید شده در فلس جفتی گروه یک نسبت به فلس جفتی گروه چهار بود (شکل ۶).

نتایج مطالعه Yanagawa & Osaki (1996) بر کشت درون‌شیشه‌ای گیاه آماریلیس نشان داد که بیشترین درصد باززایی از فلس‌های تهیه‌شده از لایه‌های خارجی پیاز حاصل گردید و کمترین میزان آن به ریزنمونه‌های تهیه‌شده از لایه‌های داخلی پیاز اختصاص داشت. در پژوهش دیگری که بر روی گیاه لیلیوم انجام شد، مشخص گردید که فلس‌های تهیه‌شده از لایه‌های خارجی پیاز نسبت به لایه‌های میانی و داخلی از لحاظ باززایی، عملکرد بهتری از خود نشان دادند (Lian *et al.*, 2009). تفاوت در میزان باززایی لایه‌های فلسی پیاز، به‌علت محتوای درونی هورمون‌های آنها می‌باشد. به‌عبارت دیگر محتوای نسبی تسریع‌کننده‌ها و کندکننده‌های رشدی در لایه‌های فلسی پیاز، در این امر دخیل می‌باشد و پتانسیل باززایی فلس‌ها از طریق تعادل بین این دو نوع هورمون داخلی کنترل می‌گردد (Jin *et al.*, 2004).

مقایسه تعداد ریشه‌های تولید شده در گروه‌های مختلف فلس جفتی نشان داد که بیشترین پتانسیل تولید ریشه در فلس جفتی گروه یک مشاهده شد، ولی با این حال تفاوت معنی‌داری از این نظر، با فلس جفتی گروه دو نداشت (P≤۰/۰۵). کمترین تعداد ریشه تولید شده نیز در فلس‌های جفتی گروه سه و چهار مشاهده شد (شکل ۷). با توجه به این نتایج چنین به نظر می‌رسد که فلس‌های خارجی‌تر پیاز (گروه ۱)، پتانسیل تولید ریشه بیشتری را دارند. پاسخ ریشه‌زایی مناسب‌تر فلس‌های جفتی حاصل از لایه‌های خارجی در مقایسه با لایه‌های داخلی پیاز آماریلیس، توسط محققان دیگری نیز تأیید شده است (Huang *et al.*, 1990; Tombolato *et al.*, 1994).

اثر متقابل غلظت‌های مختلف ساکارز و موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر وزن خشک سوخک باززاشده

نتایج نشان داد که غلظت‌های متفاوت ساکارز و موقعیت‌های مختلف فلس جفتی در پیاز مادری تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن خشک سوخک باززاشده آماریلیس داشت (P≤۰/۰۵). بررسی داده‌های آزمایش نشان داد که با کاربرد فلس جفتی گروه یک و افزودن ساکارز با غلظت ۶۰ گرم در لیتر به محیط کشت، بیشترین میزان وزن خشک سوخک‌های باززاشده حاصل گردید که تفاوت چشم‌گیری با سایر تیمارها داشت. کمترین میزان این صفت نیز در تیمار ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و کاربرد فلس جفتی گروه چهار مشاهده شد (جدول ۳).



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر تعداد ریشه تولیدشده آماریلیس

Figure 7. Mean comparison effect of scale position in the mother bulb on the number of produced roots of amaryllis

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف ساکارز و موقعیت فلس جفتی بر وزن خشک (گرم) سوخک باززاشده آماریلیس

Table 3. Mean comparison interaction effect of different concentrations of sucrose and scale position on dry weight (gram) of regenerated bulblet of amaryllis

Scale position / Sucrose concentration	Twin scale Group 1	Twin scale Group 2	Twin scale Group 3	Twin scale Group 4
30 g/l	0.036 b	0.029 bcd	0.024 de	0.011 g
60 g/l	0.057 a	0.034 bc	0.033 bc	0.029 bcd
90 g/l	0.025 cde	0.019 efg	0.021 def	0.013 fg

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different at probability level of 5% based on LSD test.

Staikidou *et al.* (2005) نیز بیان نمودند که افزایش غلظت ساکارز از ۳۰ به ۶۰ گرم در لیتر، منجر به افزایش وزن خشک سوخک‌های تولیدی در دو رقم نرگس در شرایط درون‌شیشه‌ای گردید. در پژوهشی که بر روی گیاه آماریلیس رقم Apple Blossom انجام شد، مشخص گردید بیشترین وزن سوخک تولیدی، از فلس‌های جفتی تهیه‌شده از لایه‌های خارجی پیاز حاصل گردید (Jintapakorn, 1998). میزان رشد سوخک‌ها وابسته به محتوای ذخایر غذایی موجود در فلس‌های جفتی می‌باشد (Rice *et al.*, 2011). ازآنجایی‌که فلس‌های تهیه‌شده از لایه‌های خارجی پیاز در مقایسه با لایه‌های داخلی پیاز، بزرگ‌تر می‌باشند، بنابراین حاوی ذخایر غذایی بیشتری می‌باشند. لذا سوخک‌های تولیدشده از این ریزنمونه‌ها، وزن بیشتری را نیز به‌خود اختصاص می‌دهند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل نشان داد که کاربرد فلس جفتی گروه یک و افزودن ساکارز با غلظت ۶۰ گرم در لیتر به محیط کشت، منجر به تولید سوخک‌هایی با بیشترین میزان وزن خشک گردید که تفاوت چشم‌گیری با سایر تیمارها داشت. با افزایش غلظت ساکارز از ۶۰ به ۹۰ گرم در لیتر، کاهش شدیدی در قطر سوخک باززاشده مشاهده شد. بررسی اثر شرایط روشنایی و یا تاریکی نیز نشان داد که ریزنمونه‌های رشدیافته در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در مقایسه با شرایط تاریکی، تعداد سوخک بیشتری تولید نمودند. همچنین از لحاظ قطر سوخک باززاشده، شرایط روشنایی نسبت به شرایط تاریکی برتری داشت. یافته‌های پژوهش حاضر برتری فلس‌های جفتی لایه‌های خارجی پیاز را در مقایسه با لایه‌های داخلی پیاز نشان داد. سوخک‌های باززاشده از فلس‌های جفتی گروه یک نسبت به سایر تیمارها قطورتر بودند و وزن تر و خشک بیشتری را نیز به خود اختصاص دادند.

REFERENCES

1. Asadi, A., Kafi, M., Nabati, J. & Goldani M. (2018). Effect of different light sources in *in vitro* on growth, morphology and minituber production of potato (*Solanum tuberosum* L.) in hydroponic conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science,* 48 (4), 933-941. (in Farsi)
2. Azimzadeh, Z., Mohebodini M. & Chamani E. (2018). Effects of plant growth regulators and ultrasound treatments on *in vitro* rooting and callogenesis of *Lilium ledebourii* Boiss. *Iranian Journal of Horticultural Science,* 48 (4), 845-854. (in Farsi)
3. Bagheri, A.R. & Safari, M. (1997). *Basics of plant tissue culture.* R.L.M. Pierik, Ferdowsi University Press, Mashhad. (in Farsi)
4. Chamani, A., Torabi Giglo, M. & Pourbirami, J. (2009). Effect of naphthalene acetic acid, tidiazuron, sucrose and explant type on production of Narcissus bulblet under *in vitro* conditions. In: *National Conference on Water, Soil, Plant and Mechanization of Agriculture*, 2-3 March, Islamic Azad University, Dezful Branch, pp. 145-149. (in Farsi)
5. Chow, Y.N., Selby, C. & Harvey, B.M.R. (1992). Stimulation by sucrose of Narcissus bulbil formation *in vitro*. *Journal of Horticultural Science,* 67(2), 289-293.
6. Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. (2002). Micropropagation of the rare *Eucrosia stricklandii* (*Amaryllidaceae*) by twin-scaling and shake liquid culture. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology,* 77(6), 739-743.
7. De Bruyn, M.H. (1997). *Micropropagation of amaryllis (Hippeastrum × hybridum).* In: Bajaj, Y.P.S.

www.SID.ir

Archive of SID

Biotechnology in agriculture and forestry 40, High-tech and micropropagation VI. Springer Verlag, Heidelberg, New York.
8. De Bruyn, M.H., Ferreira, D.I., Slabbert, M.M. & Pretorius, J. (1992). *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31(3), 179-184.
9. Fatima, N., Ahmad, N., Ahmad, I. & Anis, M. (2015). Interactive effects of growth regulators, carbon sources, pH on plant regeneration and assessment of genetic fidelity using single primer amplification reaction (SPARS) techniques in *Withania somnifera* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 177, 118-136.
10. Hosseini, R., Moradnejad, M., Nezami-Alanagh, E., Ashrafi, S. & Ghane-Golmohammadi, F., (2013). Somatic embryogenesis and bulblet production in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi: effect of plant growth regulators, light intensi-ty, sucrose concentration, methyl jasmonate and anti-gibberellins. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding,* 2(1), 27-34. (in Farsi)
11. Huang, C.W., Okubo, H. & Uemoto, S. (1990). Importance of two scales in propagating *Hippeastrum hybridum* by twin scaling. *Scientia Horticulturae,* 42, 141-149.
12. Jacobs, G., Richard, M., Allderman, L.A. & Theron, K.I. (1992). Direct and indirect organogenesis in tissue cultures of *Nerine bowdenii* W. Watts. In: *VI International Symposium on Flower Bulbs,* 325, 475-480.
13. Jin, S., Yang, L., Lv, P. & Zhou, B. (2004). Changes of endogenous hormones in *Lilium pumilum*. *Journal of Northeast Forestry University,* 33(1), 20-22.
14. Jintapakorn, W. (1998). *Growth and development of amaryllis bulb*. M.SC. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
15. Lee, S.Y., Ahn, J.H. & Park, Y.J. (2004). Effects of growth regulators and sucrose concentrations on the bulblet formation through *in vitro* culture of scale segment in *Nerine bowdenii*. *Journal of Plant Biotechnology*, 31(2), 139-143.
16. Lian, T., Qun-Xian, D., Yong-Qing, W., Lu, L., Shi-Feng, L., Qing-Chun, Z., Jian-Xin, L. & Xiu-Lan, L.V. (2009). Studies on the technique of tissue culture and rapid propagation of bulbils from *Lilium regale*. *Plant Sciences Research,* 2(2), 14-19.
17. Ming, S., Xiao-fan, L., Ying, K., Jin-fang, S. & Qi-xiang, Z. (2012). Polyploidy induction of three *Lilium* species endemic to China (*Lilium pumilum*, *L. sargentiae*, *L. tsingtauense*). *Acta Horticulturae,* 935, 82-83.
18. Mojtahedi, N. & Azadi, P. (2008). Comparison of bulb production in two commercial cultivars of *Lilium longiflorum* cv. Gironde and *L. longiflorum* cv. Cassandra in *in vitro* conditions. *Journal of Seed and Plant*, 24 (4), 721-738. (in Farsi)
19. Morán, G.P., Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. (2003). Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. *Scientia Horticulturae*, 98(1), 49-60.
20. Padasht Dehkaei, M.T., Khalighi, A., Naderi, R. & Mousavi, A. (2006). Effects of temperature, propagation media and scale position on bulblet regeneration of Chelcheragh lily (*Lilium ledebouri* Boiss.) by scaling method. *Seed and Plant Improvment Journal,* 22(3), 383-397. (in Farsi)
21. Park, N. (1994). Effect of temperature, scale position, and growth regulators on the bulblet formation and growth during scale propagation of *Lilium*. In: *International Symposium on the Genus Lilium*, 414, 257-262.
22. Pierik, R.L.M. & Ippel, B.J. (1977). Plantlet formation from excised bulb scale segments of Nerine. In: *International Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes,* 78, 197-202.
23. Rees, A.R. & Hanks, G.R. (1980). The twin-scaling technique for *Narcissus* propagation. In: *III International Symposium on Flower Bulbs*, 109, 211-216.
24. Rice, L.J., Finnie, J.F. & Van Staden, J. (2011). *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal of Botany*, 77(2), 305-312.
25. Rikken, M. (2010). The European market for fair and sustainable flowers and plants. Trade for Development Centre - BTC (Belgian Development Agency), 1-62.
26. Seabrook, J.E.A. & Cumming, B.G. (1977). The *in vitro* propagation of amaryllis (*Hippeastrum* spp. Hybrids). *In Vitro*, 13(12), 831-836.
27. Sharifi A., Moshtaghi, N. & Bagheri, A.R. (2010). *Applied plant tissue culture.* First Edition, Jahad-e-Daneshgahi Publication, Mashhad. (in Farsi).
28. Staikidou, I., Selby, C. & Hanks, G. (2004). Stimulation of *in vitro* bulblet growth in *Galanthus* species with sucrose and activated charcoal. In: *V International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding,* 725, 421-426.
29. Staikidou, I., Watson, S., Harvey, B.M. & Selby, C. (2005). *Narcissus* bulblet formation *in vitro*: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(3), 313-320.

www.SID.ir

Archive of SID

30. Stancato, G.C. & Mazzafera, P. (1995). Effects of light on the propagation and growth of bulbs of *Hippeastrum hybridum* cv. Apple Blossom (*Amaryllidaceae*). *Scientia Agricola,* 52(2), 331-334.
31. Stancato, G.C., Mazzafera, P. & Magalhães, A.C. (1995). Dry matter partitioning during the propagation of *Hippeastrum hybridum* as affected by light. *Scientia Horticulturae,* 62(1), 81-87.
32. Sultana, J., Sultana, N., Siddique, M.N.A., Islam1, A.K.M.A., Hossain, M.M. & T., Hossain. (2010). *In vitro* bulb production in hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). *Journal of Central European Agriculture,* 11(4), 469-474.
33. The Swedish chambers of commerce. (2011). Market report focus on the EU and Swedish market for Floricultural Products, 1-31.
34. Tipirtamaz, R. (2003). Rooting and acclimatization of *in vitro* micropropagated snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.) bulblets. *Akdeniz universitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* 16(2), 121-126.
35. Tombolato A.F.C., Azevedo C. & Nagai V. (1994). Effects of auxin treatments on *in vivo* propagation of *Hippeastrum hybridum* Hort. by twin scaling. *HortScience,* 29(8), 922-924.
36. Trinklein, D. (2009). Amaryllis: an alternative plant for the holidays. *Division of Plant Sciences*, 15(12), 91.
37. Van Aartrijk, J. & Van der Linde, P.C.G. (1986). *In vitro* propagation of flower-bulb crops. *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops*, 317-331.
38. Varshney, A., Dhawan, V. & Srivastava, P.S. (2000). A protocol for *in vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 36(5), 383-391.
39. Witomska, M., Łukaszewska, A. & Wojtowicz, M. (2008). Micropropagation of *Hippeastrum* × *chmielii* Chm. from scale and scape explants. *Propagation of Ornamental Plants*, 8(3), 158-160.
40. Yanagawa, T. & Osaki, T. (1996). *In vitro* propagation of bulblets and elimination of viruses by bulb scale cultures of *Hippeastrum hybridum* bulbs. *Plant Tissue Culture Letters,* 13(2), 147-152.
41. YongKweon, Y. & ByungWoon, K. (2006). Effects of scale position and cutting condition on bulblet growth in perforated polyethylene film bag in scaling of *Lilium longiflorum* 'Gelria'. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology,* 24(2), 279-284.

www.SID.ir