

بررسی جنین‌زایی سوسن چلچراغ *Lilium ledebourii* (Baker) boiss از طریق کشت

تخمندان تحت شرایط درون شیشه‌ای

یونس پوریرامی هیر*، محسن باقریان شام اسبی و اسماعیل چمنی

ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴

چکیده

سوسن چلچراغ یکی از گونه‌های زینتی بی‌نظیر است که اصلاح آن اهمیت زیادی دارد. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد (پیکلرام و تیدیاژورون) بر جنین‌زایی و باززایی گیاه سوسن چلچراغ از طریق کشت تخمدان بود. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. برای کالوس‌زایی از محیط کشت B5 با تیمارهای هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر بنزیل‌آدنین (BA) و ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) و دو ترکیب پیکلرام (Pic) (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر) و تیدیاژورون (TDZ) (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر) برای جنین‌زایی در محیط کشت B5 مورد استفاده قرار گرفت. محیط B5 جامد بدون هورمون نیز برای القای باززایی مورد استفاده قرار گرفت. کالوس‌های بدست آمده از تیمار مذکور برای تولید جنین به محیط جنین‌زایی تحت تیمار تاریکی انتقال داده شدند. شاخص‌هایی از قبیل تعداد جنین، درصد جنین‌زایی، قطر جنین، طول جنین، وزن تر جنین و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل هورمون TDZ و Pic بر تعداد جنین و قطر جنین در سطح احتمال یک درصد و بر وزن کالوس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود، همچنین اثر اصلی هورمون تیدیاژورون بر وزن تر جنین و اثر اصلی هورمون پیکلرام نیز بر درصد جنین‌زایی معنی‌دار شد. بیشترین وزن تر جنین در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر TDZ حاصل شد و بیشترین قطر جنین (۴/۰۶ میلی‌متر) از تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ + یک میلی‌گرم در لیتر Pic بدست آمد. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۶/۳۵٪) گیاهچه‌های باززایی شده نیز در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پیکلرام، تخمدان، جنین‌زایی، سوسن چلچراغ، کالوس.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: younes_ph62@uma.ac.ir

مقدمه

است (۱۹). انتشار جغرافیایی آن منطقه داماش عمارلو و درفک در شهرستان رودبار، کلاردشت مازندران، منطقه لنکران آذربایجان و منطقه خانقاه در استان اردبیل است (۶).

ریز ازدیادی در گیاهان پیازی به‌عنوان مؤثرترین روش برای تکثیر رویشی مورد استفاده قرار گرفته است (۸). مطالعات متعددی روی باززایی درون شیشه‌ای پیازچه‌ها در سوسن با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف انجام گرفته

سرزمین ایران با داشتن ۸۰۰۰ گونه گیاهی از مراکز اصلی گونه‌های بومی در جهان است. یکی از این گیاهان خودرو، گل سوسن چلچراغ است (۷). سوسن چلچراغ یا سوسن سفید با نام علمی *Lilium ledebourii* (Baker) boiss متعلق به تیره سوسنیان (*Liliaceae*) و یکی از مهمترین گل‌های پیازی در سراسر جهان است که گل‌های بزرگ معطر و چند رنگ با ماندگاری بالایی دارد (۷ و ۱۰). سوسن جزء گیاهان پیازدار، تک‌لپه‌ای و دائمی (۹) و یک گیاه زینتی چندساله با ارزش زینتی، دارویی و خوراکی

گیاهان پیازی از لحاظ ارزش تجاری جزء گیاهان با ارزش محسوب می‌شوند. در صنعت گل این گیاهان جایگاه ویژه‌ای داشته و در اغلب فصول قابل عرضه می‌باشند. در کشور ما تکثیر عموم گیاهان به روش سنتی صورت می‌گیرد و این روش در گیاهان اهلی نشده به دلیل احتمال انقراض روش نامناسبی می‌باشد همچنین از بزرگترین معایب ازدیاد سنتی سوسن بازده کمتر این روش ازدیاد می‌باشد بطوریکه با احتساب تلفات پیازچه‌های تولید شده و همچنین با در نظر گرفتن این مسأله که در اغلب روش‌های ازدیاد سنتی پیاز مادری نیز از بین می‌رود، به نظر می‌رسد تعداد پیازچه‌های تولید شده از هر پیاز بالغ، رقم قابل توجهی نباشد. در حالت کلی روند تکثیر در گیاهان پیازی، مخصوصاً گیاهان تیره سوسنیان کند می‌باشد، از این رو روش‌های نوین ازدیاد برای چنین گیاهان با ارزشی روز به روز در حال گسترش می‌باشند.

از آنجائیکه سوسن چلچراغ یکی از گونه‌های زینتی بی‌نظیری بوده و جزء آثار ملی کشور محسوب می‌شود و با توجه به اهمیت این گیاه و سازگاری بسیار مناسب آن با آب و هوای کشور، دارا بودن منبع ژنی غنی از جمله صفات مقاومت به سرما و بیماری و همچنین با توجه به اینکه این گل در منطقه خانقاه اردبیل به صورت خودرو رشد می‌کند، تحقیق در زمینه اصلاح این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار است. لذا پژوهش حاضر نیز در همین راستا از طریق کشت اندام زایشی صورت گرفته که در این راستا اولین قدم باززایی گیاه از مادگی سوسن می‌باشد. کشت مادگی روشی است که می‌توان با استفاده از آن علاوه بر حذف موانع موجود در مسیر گرده‌افشانی، گیاهان هاپلوئید را نیز از طریق القاء تخمک‌های موجود در آن بدست آورد. در این تحقیق، تاثیر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، بر کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی گیاه سوسن چلچراغ از طریق کشت مادگی (تخم‌دان) مورد بررسی قرار گرفته است.

است. به‌منظور تکثیر سوسن‌ها، اگر چه از اندام‌های مختلف مثل فلس پیاز، برگ، ساقه، گلبرگ و دم‌گل می‌توان به‌عنوان ریزنمونه برای کشت بافت استفاده کرد (۲ و ۱۴) ولی مطالعات کمی در رابطه با جنین‌زایی و باززایی این گیاه از اندام‌های زایشی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای برای بررسی جوانه‌های جانبی و تشکیل جنین در گل ژبررا از کشت تخمک استفاده شده است (۲۱). هان و همکاران (۱۷) اظهار کردند که در بین انواع سیتوکنین‌های آزمایش شده، محیط حاوی ۲/۲ ماکرومول BA در افزایش رشد شاخه‌های گرفته شده از فلس‌های لیلیوم Oriental hybrid رقم Casaltlanca، بسیار مؤثر بوده است. کی و همکاران (۲۴) برای القاء کالوس‌های رویان‌زا اثر پیکلرام را به تنهایی و یا با NAA و TDZ روی ریزنمونه‌های *L.oriental* × *trumpet Robina* را مورد مطالعه قرار دادند آن‌ها نشان دادند که ترکیب ۲/۲ میلی‌گرم NAA و ۰/۱ میلی‌گرم TDZ، بهترین عملکرد را در میزان القاء کالوس‌ها از محور ساقه داشت. تهامی و همکاران (۴) در تحقیقات خود در مورد بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی سوسن چلچراغ در شرایط درون شیشه‌ای نشان دادند که در آزمایش اول محیط کشت MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و محیط کشت MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به تنهایی و در آزمایش دوم نیز محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین ترکیب تیماری برای کالوس‌زایی بود. همچنین پوربیرامی هیر و همکاران (۳) به منظور بررسی امکان باززایی گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید در گیاه سوسن چلچراغ، نشان دادند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر پیکلرام بهترین غلظت برای تولید کالوس از بساک و مادگی و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و نیز غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید، بیشترین میزان جنین‌زایی را از مادگی داشتند.

مواد و روشها

منبع گیاهی: برای انجام این پژوهش، غنچه‌های گل سوسن چلچراغ از رویشگاه طبیعی خود در منطقه خانقاه اردبیل در مورخه پنجم خرداد ماه سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد و در داخل جعبه یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند و سپس غنچه‌ها در داخل محلول ساکارز ۳۰٪ به مدت ۴۸ ساعت در تیمار سرمایی در دمای ۴ °C قرار گرفتند.

ضدعفونی ریزنمونه‌ها: برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها، ابتدا قسمت دمگل و برگ‌های متصل به آن حذف شدند. پس از این مرحله غنچه‌های جدا شده در داخل بشر حاوی توری قرار داده شدند و همراه با چند قطره مایع ظرفشویی به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس جهت ضدعفونی سطحی، ریزنمونه‌ها به مدت ۴۵ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضدعفونی شدند. ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل در سه نوبت به مدت ۱۵ و ۵،۱ دقیقه شستشو داده شدند. پس از این مرحله نمونه‌ها به یک پتری‌دیش استریل منتقل شدند تا عمل برش بر روی آن‌ها انجام گیرد.

کشت ریزنمونه‌ها جهت کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی: ابتدا کلاله و خامه از تخمدان جدا شدند و سپس هر تخمدان به صورت عرضی به ده قسمت مساوی تقسیم و بر روی محیط کشت B5 (۵) جامد حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۵،۶ گرم در لیتر آگار جهت کالوس‌زایی کشت شدند نمونه‌ها در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه‌ها بعد از گذشت یک ماه از کشت، واکنش شده و در طی حدود هفت ماه و پنج بار واکنش کالوس تولید کردند. کالوس‌های بدست آمده برای تولید جنین به محیط جنین‌زایی در شرایط تاریکی انتقال داده شدند.

جهت جنین‌زایی از کالوس‌هایی به قطر پنج میلی‌متر و محیط کشت B5 جامد با ترکیب هورمونی تیدیاژرون (TDZ) در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و پیکلرام (Pic) نیز در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. در همه کالوس‌های انتقال داده شده به محیط جنین‌زایی، بعد از ۴۰ روز جنین‌زایی صورت گرفت و شاخص‌هایی از قبیل تعداد جنین، درصد جنین‌زایی، قطر جنین، طول جنین، وزن تر جنین و وزن تر کالوس اندازه‌گیری شدند. سپس جنین‌ها جهت القای باززایی به محیط B5 بدون هورمون منتقل شدند و پس از گذشت یک ماه صفات تعداد پیازچه، وزن پیازچه، قطر و طول پیازچه، تعداد برگ و ریشه، طول ریشه، درصد ریشه زایی و باززایی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

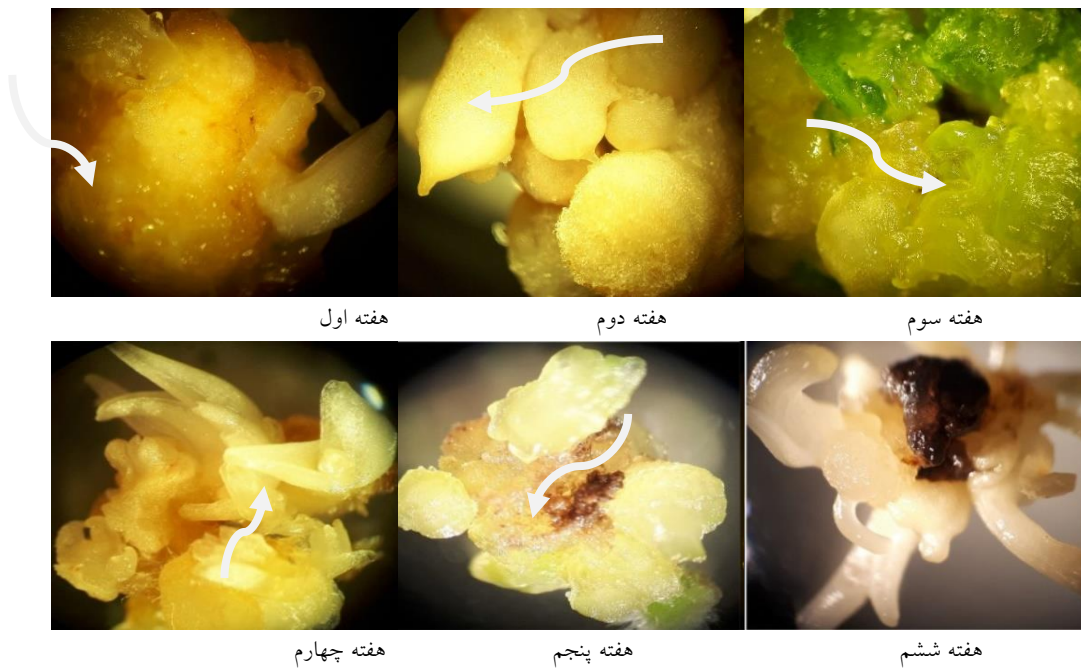
آنالیز آماری داده‌ها

پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام گردید. قبل از آنالیزهای آماری، آزمون تست نرمال بودن داده‌ها انجام شد. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ محاسبه گردید.

نتایج

تأثیر هورمون تیدیاژرون و پیکلرام بر برخی صفات جنین‌زایی: در همه کالوس‌های انتقال داده شده به محیط جنین‌زایی، بعد از ۴۰ روز تشکیل جنین صورت گرفت (شکل ۱). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل هورمون تیدیاژرون و پیکلرام بر تعداد جنین و قطر جنین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده و بر وزن‌تر کالوس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد، اثر متقابل نوع هورمون بر درصد جنین‌زایی و وزن‌تر جنین معنی‌دار نبوده اما اثر اصلی هورمون تیدیاژرون بر وزن‌تر جنین در سطح احتمال پنج درصد

معنی‌دار بود. اثر اصلی هورمون پیکلرام نیز بر درصد جنین‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد در حالی که اثرات متقابل و اصلی بر طول جنین معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۱).



شکل ۱- جنین‌زایی در طول هفته اول تا ششم در کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5 (تیمار شاهد) بزرگنمایی 4x

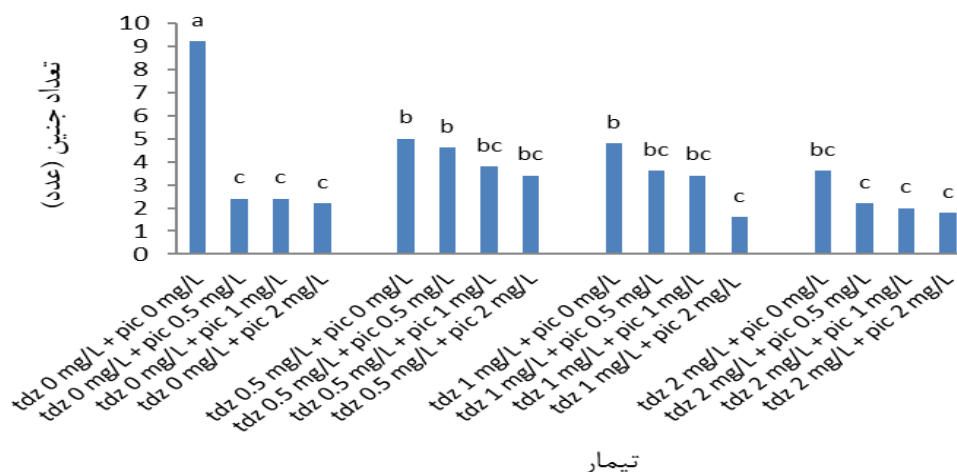
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر هورمون تیدیاژرون و پیکلرام بر صفات جنین‌زایی حاصل از کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد جنین (عدد)	درصد جنین‌زایی (%)	میانگین		قطر جنین (میلی‌متر)	وزن تر کالوس (گرم)
				وزن تر (گرم)	طول جنین (میلی‌متر)		
TDZ	۳	۰/۹۲۵**	۰/۷۱۵ ^{NS}	۰/۰۰۹*	۱/۶۷۹ ^{NS}	۰/۷۲۵ ^{NS}	۰/۰۸۵**
Pic	۳	۲/۷۲۱**	۱۷/۵۸۶**	۰/۰۰۷ ^{NS}	۳/۰۰۲ ^{NS}	۰/۱۳۵ ^{NS}	۰/۰۸۹**
TDZ×Pic	۹	۰/۴۶۵**	۱/۴۷۷ ^{NS}	۰/۰۰۳ ^{NS}	۱/۶۸۶ ^{NS}	۲/۲۲۵**	۰/۴۷*
خطا	۶۴	۰/۱۵۲	۱/۰۷۲	۰/۰۰۲	۱/۱۱۱	۲/۷۴۴	۰/۰۱۸

NS، *، **؛ به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

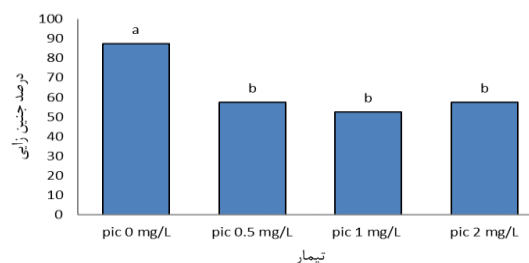
بیش‌ترین درصد جنین‌زایی (۸۷/۵ درصد) در محیط کشت B5 فاقد هورمون و کمترین درصد جنین‌زایی (۵۱/۵ درصد) در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلرام، مشاهده شد (شکل ۳).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد ریزنمونه‌های کشت شده در گروه شاهد (محیط کشت B5 بدون هورمون) با ۹/۲ عدد بیش‌ترین تعداد جنین و در محیط کشت B5 حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۲ میلی‌گرم در لیتر Pic، با ۱/۶ عدد کمترین تعداد جنین را دارند (شکل ۲). همچنین

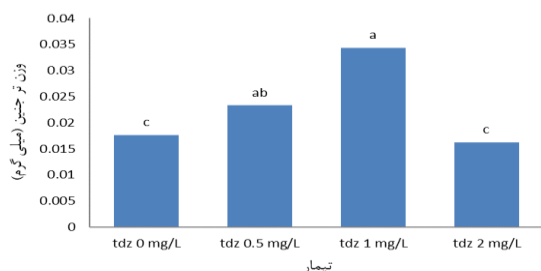


شکل ۲- تأثیر تیمارهای مختلف بر تعداد جنین تولید شده از کالوس حاصل از کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5

(۴/۰۶ میلی‌متر) و کم‌ترین (۲/۲ میلی‌متر) قطر جنین نیز به ترتیب از محیط کشت B5 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی‌گرم در لیتر Pic، و صفر میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱ میلی‌گرم در لیتر Pic، حاصل شد (شکل ۵).

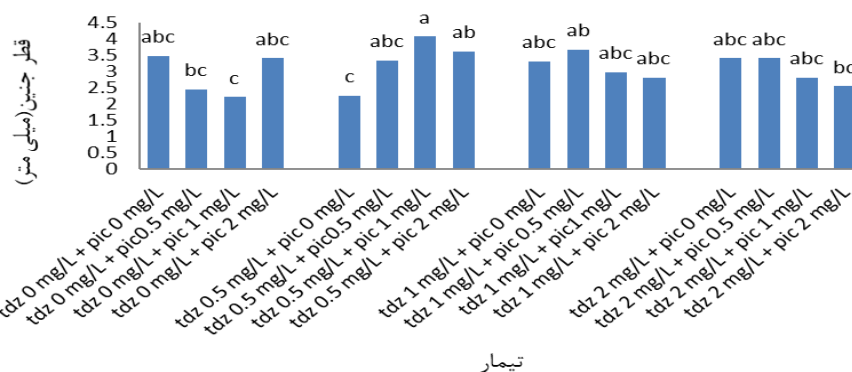


شکل ۳- تأثیر تیمارهای مختلف بر درصد جنین‌زایی در کالوس حاصل از کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5



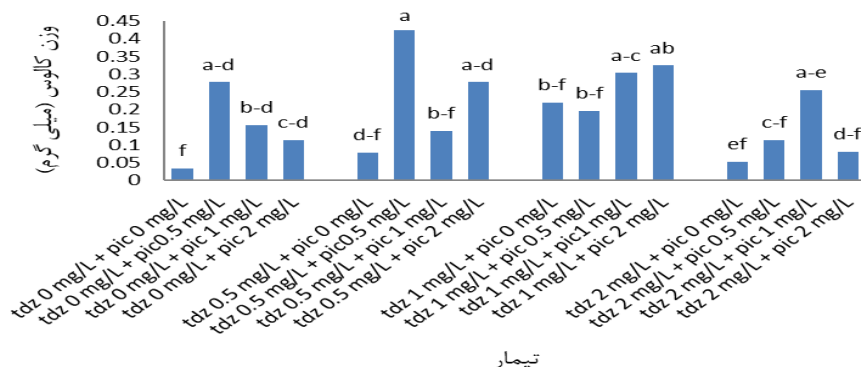
شکل ۴- تأثیر تیمارهای مختلف بر وزن تر جنین تولید شده از کالوس حاصل از کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5

همچنین بیشترین وزن‌تر جنین (۰/۰۳۴ گرم) در محیط کشت B5 تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ، و کم‌ترین وزن‌تر جنین (۰/۰۱۶ گرم) در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ، بدست آمد (شکل ۴). بیشترین



شکل ۵- تأثیر تیمارهای مختلف بر قطر جنین تولید شده از کالوس حاصل از کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5

بیشترین وزن کالوس (۰/۴۲ گرم) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Pic، و کمترین آن (۰/۰۳ گرم) از محیط کشت B5 شاهد (بدون هورمون)، بدست آمد (شکل ۶).



شکل ۶- تأثیر تیمارهای مختلف بر وزن تر کالوس بعد از جنین زایی در کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل همه‌ی صفات مورد بررسی به جز قطر پیازچه غیر معنی‌دار بودند، اما اثرات اصلی در صفات تعداد و طول پیازچه معنی‌دار بودند. اثر اصلی هورمون تیدیاژرون بر درصد ریشه‌زایی نیز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر هورمون تیدیاژرون و پیکلام بر برخی صفات باززایی در کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5

میانگین مربعات										
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد پیازچه (عدد)	وزن پیازچه (گرم)	قطر پیازچه (میلی‌متر)	طول پیازچه (میلی‌متر)	تعداد برگ (عدد)	تعداد ریشه (عدد)	طول ریشه (میلی‌متر)	درصد ریشه‌زایی (%)	درصد
TDZ	۳	۱/۰۷۲**	۰/۰۴۵ ^{ns}	۰/۰۱۵ ^{ns}	۰/۸۲۲**	۰/۶۶۳ ^{ns}	۰/۷۱۰ ^{ns}	۴۹/۸۱۶ ^{ns}	۸۲/۲۴۴**	۶/۱۴۲ ^{ns}
Pic	۳	۱/۴۲۷**	۰/۰۶۹ ^{ns}	۱/۰۸۵ ^{ns}	۰/۴۱۷*	۰/۳۹۱ ^{ns}	۰/۴۱۹ ^{ns}	۲۴/۴۶۶ ^{ns}	۱۱/۹۵۹ ^{ns}	۳/۸۷۷ ^{ns}
TDZ×Pic	۹	۰/۲۶۶ ^{ns}	۰/۰۲۸ ^{ns}	۱/۰۴۲**	۰/۱۶۶ ^{ns}	۰/۷۳۲ ^{ns}	۰/۳۲۱ ^{ns}	۱۳/۲۸۳ ^{ns}	۳/۵۴۵ ^{ns}	۱/۶۵۶ ^{ns}
خطا	۴۸	۰/۲۱۷	۰/۰۳۰	۰/۴۹۲	۰/۱۵۱	۰/۶۷۹	۰/۴۰۸	۲۲/۶۶۴	۷/۶۹۴	۳/۶۱۰

ns, *, ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف تیدیاژرون و پیکلام نشان می‌دهد که بیشترین (۳/۵۶ عدد) تعداد پیازچه در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد که با غلظت‌های نیم و یک میلی‌گرم در لیتر تیدیاژرون از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. همچنین بالاترین طول پیازچه (۶/۲۶ میلی‌متر) در غلظت نیم میلی‌گرم بر لیتر پیکلام حاصل شد (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف تیدیاژرون و پیکلام نشان می‌دهد که بیشترین (۳/۵۶ عدد) تعداد پیازچه در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد که با غلظت‌های نیم و یک میلی‌گرم در لیتر تیدیاژرون از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. همچنین بیشترین (۴/۶۱ عدد) تعداد پیازچه نیز در غلظت صفر میلی‌گرم در

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف تیدیاورون و پیکلرام بر تعداد پیازچه و طول پیازچه در کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت

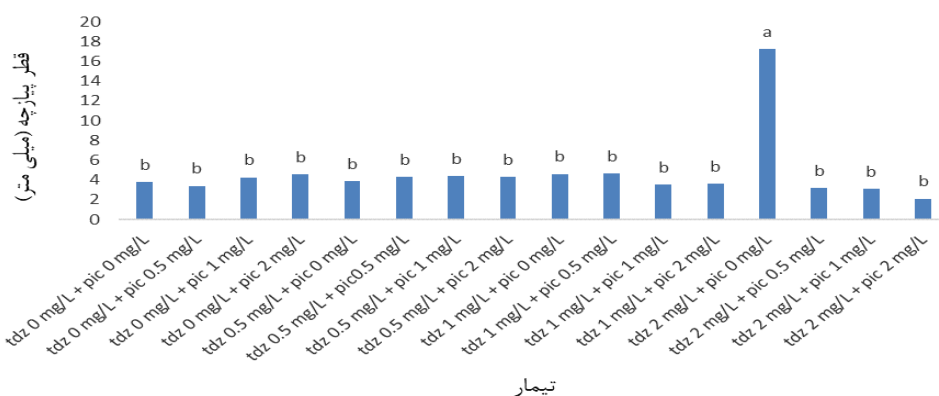
B5

غلظت‌های هورمونی	تعداد پیازچه (عدد)	طول پیازچه (میلی‌متر)
تیدیاورون		
۰ میلی‌گرم در لیتر	۳/۵۶ ^a	۵/۷۶ ^a
۰/۵ میلی‌گرم در لیتر	۳/۳۱ ^a	۵/۹۳ ^a
۱ میلی‌گرم در لیتر	۳ ^a	۶/۳۱ ^a
۲ میلی‌گرم در لیتر	۱/۷۷ ^b	۴/۴۳ ^b
پیکلرام		
۰ میلی‌گرم در لیتر	۴/۶۱ ^a	۵/۹۱ ^{ab}
۰/۵ میلی‌گرم در لیتر	۲/۵۵ ^b	۶/۲۶ ^a
۱ میلی‌گرم در لیتر	۲/۱۱ ^b	۵/۱۶ ^{ab}
۲ میلی‌گرم در لیتر	۲/۲۲ ^b	۴/۹۴ ^b

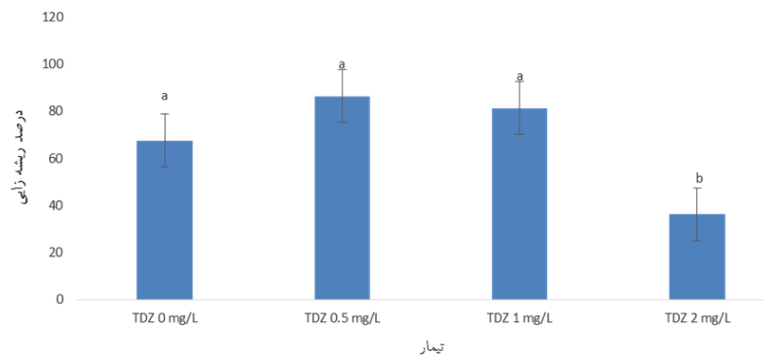
اعداد با حروف مشترک، از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند

معنی‌داری با هم نداشتند (شکل ۷). همچنین بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۶/۳۶ درصد) در تیمار هورمونی نیم میلی‌گرم بر لیتر تیدیاورون مشاهده شد (شکل ۸).

نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مختلف هورمونی نشان داد که بیشترین قطر پیازچه (۱۷/۲۰۷ میلی‌متر) در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰ میلی‌گرم در لیتر Pic بدست آمد و بقیه غلظت‌های هورمونی از لحاظ آماری اختلاف



شکل ۷- تأثیر تیمارهای مختلف بر قطر پیازچه باززایی شده در کشت تخمدان سوسن چلچراغ در محیط کشت B5



شکل ۸- تأثیر تیمارهای مختلف بر درصد ریشه زایی

بحث و نتیجه گیری

متفاوت و ترکیب اکسین‌های NAA، IBA و ۲،۴-D و سیتوکینین‌های BAP و Kin در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفت که بهترین نتیجه در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA از کالوس تولید شده، از ریزنمونه کوتیلدون و رشد طولی شاخساره‌ها نشان داده شد (۱). کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی خارجی برای القاء کالوس از تخمدان حیاتی بوده و میزان و نوع آن‌ها بستگی به غلظت درونی هورمون‌های گیاهی دارد (۱۱). ضرورت وجود یک نوع اکسین به همراه سایتوکینین برای بهبود القاء کالوس از کشت تخمدان در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است (۲۱). اکسین‌ها به تنهایی یا همراه با مقادیر کم و جزئی سایتوکینین‌ها باعث آغازش ریشه‌ها، کالوس‌زایی، جنین‌زایی و پرآوری می‌شوند. اکسین‌های NAA، 2,4-D، IBA، IAA و پیکلرام جنین‌زایی سوماتیکی را در گیاهان مختلف باعث می‌شوند (۲۷). در پژوهش حاضر، تأثیر دو هورمون تیدیاژرون و پیکلرام بر درصد جنین‌زایی نشان داد که بیشترین درصد جنین‌زایی مربوط به تیمار شاهد (صفر میلی‌گرم پیکلرام) و ۸۷/۵ درصد می‌باشد که در نتیجه افزایش غلظت پیکلرام درصد جنین‌زایی کاهش یافته است. این نتایج بیانگر بالا بودن هورمون‌های داخلی ریز نمونه کالوس که در محیط کالوس‌زایی جذب کرده و اثر بازدارندگی بر روی رشد کالوس و جنین‌زایی در محیط

مهم‌ترین عوامل مؤثر بر افزایش کارایی ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاهان، ریزنمونه، ژنوتیپ گیاهی، میزان تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت و عوامل فیزیکی می‌باشند. محققان سعی دارند با تغییر غلظت‌های مختلف هورمونی روش مناسبی برای باززایی بیشتر این گیاه در کشت بافت دست پیدا کنند. در آزمایشی، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BA بر باززایی پیازچه از ریز نمونه‌های فلسی نوعی سوسن هیبرید نیز بررسی و بیشترین پیازچه‌ها در هر ریزنمونه در محیط کشت LS و در ترکیب ۵ میکرومولار BA و یک میکرومولار NAA گزارش گردید (۲۴). در همین راستا تأثیر مثبت اکسین‌ها بر افزایش پیازچه‌زایی گل سنبل و گل لاله نیز گزارش شده است (۲۳). بررسی تأثیر ترکیب‌ها و غلظت‌های مختلف هورمونی و همچنین تأثیر پیش‌تیمار دمایی و نور بر تغییر مسیر بیولوژیکی و حرکت به سمت کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی در ریزنمونه‌های بساک خیار نشان داد که تیمار تاریکی باعث افزایش معنی‌دار درصد کالوس‌زایی و ترکیب هورمونی BAP و ۲،۴-D (۳+۱/۵) میلی‌گرم/لیتر) در هر دو ژنوتیپ باعث بیشترین القای جنین‌زایی و کالوس‌زایی شد (۵). برای تعیین بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در طول کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها در باززایی غیرمستقیم فلفل دلمه‌ای اثر غلظت‌های

داشته است و همچنین در غلظت کم (۲،۳ میکرومولار) برای باززایی جنین‌های سوماتیکی موثر بوده است (۱۵ و ۱۶). در گل رز مینیاتوری ۰/۲ میلی‌گرم TDZ به همراه یک میلی‌گرم NAA باعث ایجاد جوانه‌های نابجا در محیط کشت MS می‌شوند (۲۲). در باززایی مستقیم شاخه از کشت ریز نمونه برگ سوسن شرقی بیشترین تعداد جوانه در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ بدست آمده و همچنین باعث تولید کالوس مایل به رنگ زرد شده است (۲۸). در سوسن بیشترین جنین‌زایی سوماتیکی از ریز نمونه برگ و فلس در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم Pic و یک میلی‌گرم NAA اتفاق افتاده است (۲۷). در بررسی تأثیر NAA، Kin، 2،4-D، BA و TDZ بر کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه از کشت بساک گیاه *Curcuma attenuate* گزارش نمودند که کالوس‌زایی تنها در حضور ۴،۲-D و کیتین صورت می‌گیرد و کالوس‌های به دست آمده تنها زمانی به گیاهچه باززایی می‌شوند که در محیط کشت حاوی TDZ، کیتین و NAA قرار بگیرند و حضور TDZ برای باززایی ضروری است (۲۰).

رامسی و گالیتز (۲۰۰۳) تخمک گل سوسن *longiflorum Lilium* را در محیط کشت حاوی ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد ساکارز، یک میلی‌گرم در لیتر 2،4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BA کشته کرده و نشان دادند که تشکیل کالوس در محیط کشت حاوی ۵ درصد ساکارز بیشتر از غلظت‌های دیگر صورت گرفت (۲۵). اکسین‌ها به تنهایی یا همراه با مقادیر کم و جزئی سایتوکینین‌ها باعث آغازش ریشه‌ها می‌شوند. اکسین‌های NAA، 2،4-D، IBA، IAA و پیکلرام جنین‌زایی سوماتیکی را در گیاهان مختلف باعث می‌شوند (۲۹).

نتیجه‌گیری کلی

اثر مثبت تیمار NAA و دو ترکیب پیکلرام و تیدیازورون برای جنین‌زایی در محیط کشت B5 و صفات مربوط به

حاوی هورمون دارد. همچنین به نظر می‌رسد پدیده‌ی اندام‌زایی که شامل دو مرحله‌ی تمایزیابی و طویل شدن است تحت تأثیر هورمون‌ها قرار می‌گیرد، ولی فعالیت تمایزیابی حتماً منجر به طویل شدن و رشد سلولی نمی‌شود، بطوریکه غلظت‌های مختلف هورمون‌ها تعداد پیازچه‌ی متفاوتی تولید می‌کنند، ولی از نظر وزنی با یکدیگر فرق چندانی نداشته‌اند (۲۶).

همچنین در تأثیر دو هورمون بر وزن ترجنین، وزن تر در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ افزایش یافته و سپس با افزایش غلظت TDZ، کاهش یافت و با توجه به افزایش تولید جنین در تیمار شاهد وزن کالوس کاهش یافته و در تیمار ۱ میلی‌گرم TDZ با افزایش غلظت پیکلرام، وزن کالوس افزایش یافته است. در مطالعه‌ی نتایج تأثیر غلظت TDZ بر میزان باززایی در کشت تخمدان خیار نشان داد که با افزایش غلظت TDZ میزان باززایی افزایش یافته بطوریکه بیشترین باززایی در غلظت ۰،۶ میلی‌گرم در لیتر بوده است همچنین در محیط کشت بدون هورمون هیچ گیاهی تولید نشده است (۱۳). در جنین‌های سوماتیکی گیاه کاج Pic و NAA در مقایسه با سایر اکسین‌ها تکثیر، تولید و بلوغ بیشتر جنین‌های سوماتیکی را کاهش می‌دهد (۱۸). در تحقیقی که بر روی کشت توأم بساک و تخمدان هندوانه در محیط کشت MS جامد حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲،۴-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP حاوی بساک و محیط کشت MS مایع حاوی تخمدان انجام شد نتایج نشان دادند که بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت مایع حاوی تخمدان اتفاق افتاد (۱۲). در مطالعه دیگری، تخمک گل سوسن *longiflorum Lilium* را در محیط کشت حاوی ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد ساکارز، یک میلی‌گرم در لیتر ۲،۴-D و یک میلی‌گرم در لیتر BA کشت کردند و نتایج نشان داد که تشکیل کالوس در محیط کشت حاوی ۵ درصد ساکارز بیشتر از غلظت‌های دیگر صورت گرفته است (۲۵). در پژوهشی دیگر TDZ در غلظت زیاد (۹ میلی‌گرم) بیشترین تأثیر را در باززایی و تکثیر شاخه

ارزش استفاده کرد و با استفاده از آن میزان باززایی این گیاه را افزایش داد.

سیاسگزاری

این مقاله حاصل کار تحقیقی در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی و فضای سبز بوده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر صمیمانه خود را مسئولین محترم دانشگاه محقق اردبیلی به جهت تأمین منابع مالی مورد نیاز برای انجام این پژوهش، اعلام کنند.

آن نشان می‌دهد که این تیمارها می‌تواند تاثیر زیادی برای باززایی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای داشته باشد. با توجه به اینکه بیشترین وزن تر جنین در تیمار یک میلی-گرم در لیتر TDZ حاصل شد و بیشترین قطر جنین (۴/۰۶ میلی-متر) از تیمار ۰/۵ میلی-گرم در لیتر TDZ + یک میلی-گرم در لیتر Pic بدست آمد. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۶/۳۵٪) گیاهچه‌های باززایی شده نیز در تیمار ۰/۵ میلی-گرم در لیتر TDZ مشاهده شد. بنابراین از آنجا که تیمارهای مورد استفاده به طور مستقیم و غیرمستقیم بر میزان هورمون‌های درونزا در ریزنمونه تأثیر می‌گذارد، توصیه می‌گردد که غلظت‌های مورد استفاده تیمارهای این آزمایش در کنار سایر هورمون‌ها نیز در تکثیر این گیاه با

منابع

- ۱- اطرش، م. و مرادی، ک.، ۱۳۹۳، بررسی کالوس زائی و اندام زائی غیرمستقیم گیاه فلفل دلمه‌ای (*L. Capsicum annuum*) در شرایط کشت درون شیشه‌ای، جلد ۲۷، شماره ۳، صفحه ۳۵۵-۳۴۶
- ۲- پاداشت دهکابی، م.ن.، ا. خلیقی، ر. نادری، ا. موسوی، ۱۳۸۷. تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) و نفتالین استیک اسید (NAA) بر باززایی سوخک در سوسن چلچراغ (*lilium ledebourii*) با استفاده از ریز فلس‌های سوخ، مجله نهال و بذر، ۲۴(۲): ۳۳۵-۳۲۱.
- ۳- پور بیرامی هیر، ی.، ۱۳۸۹، بررسی امکان تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید از طریق کشت بافت در سوسن چلچراغ، علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل.
- ۴- تهامی، س. ک.، ۱۳۹۱، بررسی امکان باززایی سوسن چلچراغ از طریق کشت سلول یا پروتوپلاست، علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل.
- 10- Bakhshaie, M., Khosravi, S., Azadi, P., Bagheri, H., van Tuyt, JM., 2016. Biotechnological advances in *Lilium*. *Plant Cell Report*, 35:1799–1826.
- 11- Bhaskaran, S. and Smith, R.H. 1990. "Regeneration in cereal tissue culture: a review," *Crop science*, 30: 1328-1337.
- 12- Darbandi Azar, A., Tavakoli, F., Moladoust, H., Zare, A. and Sadeghpour, A. (2014). Echo cardio graphic evaluation of cardiac function in ischemic rats: value of M-mode echocardiography. *Research Cardiovascular Medicine*, 3(4): e22941.
- 13- Deng, Y., Tang, B., Zhou, X., 2020. Direct regeneration of haploid or doubled haploid plantlets in cucumber (*Cucumis sativus* L.) through ovary culture. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142:253-268.

- 14- Eisenreichová, E. Haladová, M. Mučaji, P. and Grančai, D. 2004. The study of constituents of *Lilium candidum* L. Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, 51: 27-37.
- 15- Gamborg, O.L.c. Miller, R.A. and Ojima, K.1968. Nutrient requirements of suspension cultures of *soybean* root cells. Experimental cell research, 50: 151-158.
- 16- Ghosh, A., Abir, U., Samir, C., 2018. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. Scientific Reports. 8.
- 17- Han, B.H., B.W. Yae, H.J. Yu and K.Y. Peak. 2005. Improvement of in vitro micropropagation of *Lilium oriental* hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. Scientia horticultrae, 103: 351-359.
- 18- Hazubska-Przybył, T., Ratajczak, E., Agata, O. and Pers-Kamczyc, E. 2020. Different Roles of Auxins in Somatic Embryogenesis Efficiency in Two *Picea* Species" International Journal of Molecular Sciences, 21(9): 3394. <https://doi.org/10.3390/ijms21093394>.
- 19- Jin, L. Zhang, Y. Yan, L. Guo, Y. and Niu, L. 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity of bulb extracts of six *Lilium* species native to China. Molecules, 17: 9361-9378.
- 20- Kou, Y., Ma, G. Teixeira da Silva, J.A. and Liu, N. 2012. Callus induction and shoot organogenesis from anther cultures of *Curcuma attenuata* Wall. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 112: 1-7.
- 21- Li, Y. Li, H. Chen, Z. Ji, L.-X. Ye, M.X. Wang, J. Wang, L. and An, X. M. 2013. Haploid plants from anther cultures of poplar (*Populus* × *beijingensis*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 114: 39-48.
- 22- Liu J, Feng H, Ma Y, et al. 2018. Effects of different plant hormones on callus induction and plant regeneration of miniature roses (*Rosa hybrida* L.). Horticulture International Journal, 2(4):201-206.
- 23- Omidi M, and Farzin N. 2012 Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. Modern Genetics Journal, 7:209-220 (in Farsi).
- 24- Qi, Y., L. Du, Y. Quan, F. Tian, Y. Liu and Y. Wang. 2014. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cell suspension cultures and plant regeneration in *Lilium tenuifolium* oriental × trumpet 'Robina'. Acta physiologiae plantarum, 36: 2047-2057.
- 25- Ramsay, J.L. Galitz, D.S. and Lee, C.W. 2003. Basal medium and sucrose concentration influence regeneration of Easter Lily in ovary culture. Hort Science, 38: 404-406.
- 26- Shin Y.K., Abdullahil Baque M., Elghamedi S., Lee E.J., and Paek K.Y. 2011. Effects of activated charcoal, plant growth regulators and ultrasonic pretreatments on in-vitro germination and protocorm formation of *Calanthe* hybrids. Australian Journal of Crop Science, 5: 582-588.
- 27- Yan, R., Wang, Ch., Wang, J. 2020. High-efficiency somatic embryogenesis techniques for different hybrids of cut lilies. Plant Cell. Tissue and Organ Culture (PCTOC), 143:145-157.
- 28- Youssef, N.M., Shaaban, S.A., Ghareeb, Z.F. 2019. *In vitro* bulb formation of direct and indirect regeneration of *Lilium orientalis* cv. "Starfighter" plants. Bull Natl Res Cent 43, 211 . <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0246-z>
- 29- Zaidi, S. J., Mikhailenko, S. D., Robertson, G. P., Guiver, M. D., & Kaliaguine, S. 2000. Proton conducting composite membranes from polyether ether ketone and heteropolyacids for fuel cell applications. Journal of Membrane Science, 173(1), 17-34.

Investigation on embryogenesis of *Lilium ledebeourii* (baker) Boiss by ovary culture under *in vitro* condition

Pourbeyrami Hir Y., Bagherian Shamasbi M. and Chamani E.

Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

Lilium ledebeourii (Baker) Boiss is one of the most unique ornamental species, which the breeding program of this plant is very important. The goal of this study was to investigate the effects of different plant growth regulator combinations on the embryogenesis and regeneration of *L. ledebeourii* by ovary culture. This research was carried out as a factorial arrangement based on a completely randomized design with 5 replications. The treatments for callus production was 0.5mg/l BA plus 0.5mg/l NAA and for embryogenesis various concentrations of picloram (0,0.5,1,2,mg/l) and tidiazuron (0,0.5,1,2,mg/l) were used in B5 medium. The B5 medium without hormones was used for induction of regeneration. The callus obtained from the mentioned treatment were transferred to embryogenesis medium under dark treatment for embryo production. The measured traits in this research included the embryo number, embryogenesis percentage, embryo diameter, embryo length, embryo fresh weight and callus fresh weight. The results showed that the interaction effect of picloram and tidiazuron on the number and diameter of embryos were significant at $P < 0.01$ level and significantly ($P < 0.05$) affected callus weight. However, the main effect of thidiazuron on embryo weight and picloram on the percentage of embryogenesis was significant. The highest amount of embryo fresh weight and embryo diameter (4.06 mm) was obtained in medium containing 1 mg/l TDZ and 0.5 mg/l TDZ+1 mg/l Pic, respectively. The highest (86.35%) percentage of rooting in regenerated plantlets was observed in B5 medium containing 0.5 mg/l TDZ.

Key words: Callus, Embryogenesis, *Lilium ledebeourii*, Ovary, Picloram.