

## BAP NAA

### Effects of plant growth regulators NAA, BAP. different explants scale photoperiod on tissue culture of *Lilium ledebourii* Boiss

معصومه معمار مشرفی<sup>۱</sup>، احمد معینی<sup>۲</sup> و ایرج توسلیان<sup>۳</sup>

*Lilium ledebourii* Boiss

BAP

mg l<sup>-1</sup> / / /

NAA

mg l<sup>-1</sup> / /

BAP

mg l<sup>-1</sup> / BAP

NAA

mg l<sup>-1</sup> BAP

NAA

mg l<sup>-1</sup> NAA

mg l<sup>-1</sup> NAA

NNA, BAP

۱۷۲۷ گونه بومی را شامل می گردد که تقریباً ۲۵ درصد کل گونه ها می باشد. سوسن چلچراغ از گونه های خودروی جنس سوسن است که در بخش های شمالی

ایران یکی از مراکز اصلی گونه های بومی گیاهی در جهان است. این گونه ها به ۱۵۰ تیره تعلق دارد و بالغ بر

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۱/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۱/۷/۱۶

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس

۱ و ۲- استادیاران دانشگاه تربیت مدرس

غلظت های مختلف ( $0, 0,01, 0,05, 0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ) سایتوکینین های BA و 2ip اثر معنی داری بر باززایی پیازچه ها نداشتند ولی سبب رشد غیرعادی پیازچه ها شدند. انبار کردن پیازهای مادری در صفر درجه سانتیگراد به مدت یک سال سبب کاهش نیاز به NAA گردید و پس از این تیمار میزان NAA مورد نیاز برای باززایی بهینه از  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  به  $0,05$  کاهش پیدا کرد (Van-Aartrijk and Blim - Barnhoorn, 1981).

در تحقیق دیگری که به منظور تکثیر پیازچه های حاصل از کشت بافت گونه *L. japonicum* انجام گرفت. ریز نمونه های فلس این گونه بر روی محیط کشت MS حاوی NAA و سایتوکینین هایی چون BA, 2ip, Kin, Zeatin یا ترکیبی از آنها در محیط های تاریکی یا روشنایی در دماهای  $25^{\circ}\text{C}$  یا  $20^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. 2ip در مقایسه با سایر سایتوکینین ها در  $20^{\circ}\text{C}$  و روشنایی مداوم بیشترین درصد باززایی را نشان داد و تیمار  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA نتایج مشابهی داشت. (Maesto et al., 1994). در تحقیقی که به منظور مطالعه اثر نور یا تاریکی بر روی رقم *L. concolor parthenion* انجام گرفت درصد تعداد پیازچه های تشکیل شده در هر ریز نمونه تعداد پیازچه در هر فلس و قطر پیازچه در تیمار روشنایی از تیمار تاریکی بیشتر بود ولی میانگین وزن تر آن ها تفاوتی نداشت (Jeong, 1996). در مطالعه ای که بر روی رقم *L. concolor parthenion* انجام گردید، فلس ها به صورت عرضی به سه قسمت مساوی بخش های انتهایی، میانی و تحتانی تقسیم گردیدند. هر قسمت بر روی محیط کشت MS حاوی یا فاقد تنظیم کننده های رشد NAA, BA در زیر نور قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که بدون مواد تنظیم کننده رشد بهترین نتایج از بخش های تحتانی فلس به دست آمد و هیچ پیازچه ای از قسمت انتهایی فلس حاصل نگردید ولی در حضور تنظیم کننده های رشد  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  BA و  $0,01 \text{ mg l}^{-1}$  بخش های انتهایی اندام های بیشتری را تشکیل دادند (Jeong, 1996). در

ایران می روید. این گونه دارای ارزش زینتی و پتانسیل اقتصادی بالایی به عنوان یک گل جدید می باشد که به شدت در خطر انقراض قرار دارد.

به دست آوردن گیاهان محلی و خودرو به منظور استفاده بالقوه و بالفعل در صنعت گیاهان زراعی و زینتی یک امر ضروری برای تحقیقات و ایجاد نوآوری های علمی در علوم کشاورزی است. دسترسی مداوم به بهره برداری از تنوع ژنتیکی که در طبیعت یافت می شود اهمیت زیادی در تکامل و بهبود محصولات زراعی و زینتی دارد (Hannipman, 2000).

سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium ledebourii* پتانسیل بسیار بالایی را به عنوان یک گل جدید و مناسب برای عرضه به بازار گل ایران و جهان دارد. این گل بسیار زیبا از جمله گل های پیازی بوده و دارای خصوصیات مناسبی چون بلند بودن ساقه گل دهنده، دوام مناسب گل و ظاهری شگفت انگیز می باشد (قهرمان، ۱۳۷۰) به منظور معرفی و اهلی کردن گیاهان بومی خودرو مراحل مختلفی باید صورت گیرد که یکی از مهم ترین این مراحل بررسی روش های تکثیر می باشد. به علت سرعت کند و آهسته ای که سیستم های طبیعی تکثیر دارند و احتمال آلودگی مجدد و سریع مواد مادری روش های تکثیر مؤثر و سریع مورد نیاز می باشد. یک روش تکثیر که امروزه نقش مهمی در تولیدات کشاورزی به خصوص در گیاهان زینتی دارد روش کشت بافت می باشد. تکثیر از طریق کشت بافت در سوسن به صورت گسترده ای مطالعه شده و به منظور تکثیر از ریز نمونه های برگ، فلس، ساقه، گلبرگ و دمگل استفاده شده است. ثابت شده که قطعات فلس های پیاز سوسن ریز نمونه های مناسبی برای تکثیر از طریق کشت بافت هستند (Niimi, 1995).

در بررسی که بر روی رقم *L. Speciosum cv. Rubrum No10* انجام گرفت نتایج نشان دادند که NAA به میزان  $1 \text{ mg l}^{-1}$  و  $0,1$  سبب افزایش تعداد پیازچه در هر ریز نمونه فلس می گردد.

و NAA ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ mg l<sup>-1</sup> یا ترکیبی از آن‌ها به محیط‌های کشت افزوده گردید.

ریز نمونه‌های ضد عفونی شده اولیه در زیر ایرفلولامینار به دو بخش نیمه بالایی و نیمه پایینی فلس به صورت عرضی تقسیم شدند و از هر نیمه دو ریز نمونه به ابعاد ۷×۷ mm جدا گردیده و به لوله‌های آزمایشی به ابعاد ۱۸۰×۲۲ mm بر حسب تیمارهای مختلف بر روی محیط کشت قرار داده شدند. سپس لوله‌های آزمایش به دو دسته تقسیم شده یک دسته در تاریکی و دسته دیگر در روشنایی (۱۶ ساعت نور به شدت ۲۴۰۰-۱۸۰۰ لوکس) قرار داده شدند. دمای اتاقک رشد در طول آزمایش ۲۰±۲ °C بود. پس از چهار ماه فاکتورهای ارزیابی رشد و نمو پیازچه‌ها شامل: وزن کل (پینه + ریز نمونه + پیازچه‌ها)، تعداد پیازچه، وزن پیازچه، قطر پیازچه، درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه‌ها و درصد باززایی آن‌ها اندازه‌گیری گردید. سپس به منظور برطرف شدن رکود حاصل از کشت بافت پیازچه‌ها به مدت سه ماه به یخچال و دمای ۲±۵ °C منتقل گردید و پس از برطرف شدن رکود گیاهچه‌های کاملی از گیاه سوسن چلچراغ تولید گردید. به منظور بررسی و تعیین بهترین تیمارها از آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی استفاده گردید. در آزمایش کشت بافت تیمارهای مورد استفاده دو سطح تیمار نوری، دو سطح محل تهیه ریز نمونه، سه سطح تنظیم کننده رشد BAP و چهار سطح تنظیم کننده رشد NAA بودند که در سه تکرار و هر تکرار شامل چهار نمونه آزمایش بود. در پایان آزمایش داده‌های به دست آمده مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری (Statistical Analysis System) S.A.S انجام گرفته و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گرفت نمودارهای مربوطه نیز به کمک نرم‌افزار Excel تحت ویندوز

بررسی که بر روی یک رقم سوسن بومی ژاپن به نام Yuri - (*L. japonicum* Sasa) انجام گرفت نتایج نشان داد که تیمار سرمایی پس از کشت بافت به میزان حداقل ۱۲ هفته قبل از انتقال به خاک برای از بین بردن رکود پیازچه‌ها ضروری می‌باشد و باعث تسریع در رشد اندام‌ها می‌گردد (Deklerk et al., 1992).

در تحقیق حاضر اثر تنظیم کننده‌های رشد NAA، BAP و ریز نمونه موقعیت‌های مختلف فلس و دوره نوری به منظور تولید پیازچه این گل مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

پیاز سوسن چلچراغ *Lilium ledebourii* بعد از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه از محل رویش طبیعی از منطقه داماش از توابع شهرستان رودبار در استان گیلان جمع‌آوری گردیدند و پس از انتقال به آزمایشگاه به منظور ضد عفونی مواد گیاهی، ابتدا فلس‌های آسیب‌دیده و آلوده حذف شده و سپس فلس‌های سالم را از صفحه انتهایی جدا کرده و در محلول قارچکش بنومیل ۰/۲ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده پس از چند مرتبه شستشو با آب آن‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در اتانل ۷۰٪ ضد عفونی گردید و سپس آن‌ها را با آب مقطر استریل شستشو داده و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیوکلریت سدیم ۱٪ قرار داده و نهایتاً سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریز نمونه‌ها را در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) که شامل میوانوسیتول (۱۰۰ mg l<sup>-1</sup>) و نیاسین (۵ mg l<sup>-1</sup>)، پیریدوکسین (۰/۰۵ mg l<sup>-1</sup>)، تیامین (۰/۱ mg l<sup>-1</sup>)، گلیسین (۲ mg l<sup>-1</sup>)، هیدروبیات کازین (۱ g l<sup>-1</sup>) ساکارز (۳۰ g l<sup>-1</sup>)، pH نیز (۵/۷) با استفاده از سود ۱ نرمال قبل از اتوکلاو در ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه تعدیل گردید و در ۲۰ °C در تاریکی قرار داده شدند. تنظیم کننده‌های رشد BAP به میزان ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۱ mg l<sup>-1</sup>

رسم گردید.

مراحل اولیه تمایزیابی سنتز شده بودند بر روی ژل پلی آکرپل آمید پنج باند با وزن مولکولی ۱۷، ۳۲، ۶۰، ۶۲ و ۸۰ کیلو دالتون (KD) را در قطعات فلس نشان داد. مطالعات بعدی مشخص کرد که پلی پپتیدی با وزن مولکولی کم برای تمایزیابی اندام های نابجا از گیاهان عالی ضروری هستند کوشش هایی نیز در جهت به دست آوردن اطلاعاتی مبنی بر سنتز پروتئین در طی تمایزیابی پیازچه ها و سعی در جدا کردن ژن های کد کننده این پروتئین ها و نقش هورمون های گیاهی بر آن ها انجام گرفته است (Ishioka and Tanimoto, 1993).

به نظر می رسد پدیده مورفوژن که شامل دو مرحله تمایزیابی (Differentiation) و طویل شدن (Elongation) است تحت تأثیر هورمون ها قرار می گیرد ولی فعالیت تمایزیابی حتماً منجر به طویل شدن و رشد سلولی نمی شود. به طوری که غلظت های مختلف هورمون ها تعداد پیازچه متفاوتی را تولید می کنند ولی از نظر وزنی با یکدیگر فرق چندانی نداشته اند. از طرفی با توجه به رقابت شدیدتر پیازچه ها در محیط کشت بافت رقابت بین پیازچه ها بر سر به دست آوردن مواد غذایی سبب می گردد تا تیماری که دارای پیازچه بیشتری است با وجود داشتن اکسین بیشتر وزن پیازچه بیشتری را تولید نکند در قطر پیازچه ها نیز اختلاف معنی داری مشاهده نمی گردد. بیشترین وزن پیازچه نیز در تیمار BAP  $1 \text{ mg l}^{-1}$  و  $0.1$  حاصل گردید (جدول ۲) که با توجه به کمتر بودن تعداد پیازچه باززایی شده در هر ریزنمونه و در نتیجه رقابت کمتر پیازچه ها بر سر مواد غذایی امری قابل قبول به نظر می رسد. نتایج به دست آمده نشان داد پیازچه های حاصل از محیط فاقد BAP برای کشت در محیط آزاد مناسب تر هستند زیرا به زمان کمتری نیاز دارند تا به اندازه مناسب برای گلدهی برسند. هم چنین وزن تر پیازچه های باززایی شده در این آزمایش به طور مشخصی بیشتر از گزارش های سایر پژوهشگران بود که این امر ممکن است به علت اختلاف

سطوح مختلف NAA بر صفات اندازه گیری شده معنی دار گردید (جدول ۱). وزن کل در تیمار با غلظت  $1 \text{ mg l}^{-1}$   $\alpha$ -NAA حداکثر (۱/۵۸ g) و در تیمار شاهد حداقل است (۱/۰۷ g). تعداد پیازچه در غلظت  $0.1$  حداکثر (۳/۴۲) و تیمار شاهد حداقل (۲/۴۷)، وزن پیازچه در غلظت  $0.1$  حداکثر (۱۶۳/۱ mg) و حداقل در تیمار شاهد (۱۱۷/۸ mg) و درصد ریشه زایی نیز در غلظت  $0.1$  حداکثر (۶۹/۶) و در تیمار شاهد حداقل (۴۹/۷) بود. وزن کل، تعداد پیازچه، وزن پیازچه و درصد ریشه زایی در تیمار  $0.1$   $\alpha$ -NAA حداکثر و در تیمار کنترل حداقل است (جدول ۲) (شکل ۱).

اثر سطوح مختلف BAP بر صفات اندازه گیری شده نشان داد که بیشترین تعداد پیازچه در تیمار شاهد به دست آمد ولی این تیمار کمترین وزن پیازچه را تولید کرد. بیشترین درصد ریشه زایی در تیمار شاهد و حداکثر تعداد ریشه از تیمارهای شاهد و غلظت BAP  $1 \text{ mg l}^{-1}$  به دست آمد.

اصولاً کمتر پدیده ای را در گیاه می توان نام برد که هورمون ها در تنظیم آن نقش اساسی نداشته باشند تمایزیابی پیازچه های نابجا در قطعات فلس های پیازی در سوسن می تواند به وسیله تغییر در میزان هورمون ها تنظیم گردد. به نظر می رسد اثر جدا کردن فلس از پیاز مادری و تمایزیابی پیازچه به وسیله دخالت در میزان هورمون های گیاهی چون اکسین و ستیوکینین اعمال گردد. به طوری که نتایج تحقیقات (Ishioka and Tanimoto, 1993) نشان داد که در تیمار شاهد که فاقد تنظیم کننده های رشد بود، میزان پروتئین اندازه گیری شده در وزن تر هر ریزنمونه کمتر از محیط دارای تنظیم کننده های رشد NAA یا BA یا ترکیب آن ها بود. در این محیط ها میزان پروتئین در اوایل دوره کاشت به شدت افزایش یافته و سپس به تدریج تا دهمین روز کاهش یافت. تغییرات کمی پروتئین هایی که در

بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد...

در گونه، طول مدت کشت و شرایط متفاوت

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات تیمارهای نوری، نواحی مختلف فلس و تنظیم کنندگان رشد در تکثیر سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Boiss)

Table 1. Effects of plant growth regulators, scale portion and photoperiod on propagation of *Lilium ledebourii* Boiss

میانگین مربعات MS									
Treatment	منابع تغییرات	درجه آزادی df	وزن کل Total weight	تعداد پیازچه Number of bulblet	وزن پیازچه Weight of bulblet	قطر پیازچه Diameter of bulblet	درصد ریشه زایی Percentage of rooting	تعداد ریشه Number of root	درصد باززایی ریز نمونه‌ها Percentage of regeneration
Lightness (A)	نور	1	0.99**	1.95**	16.8*	8.40ns	0.891***	0.043**	344.5**
Scale Portion (B)	موقعیت فلس	1	0.12 <sup>ns</sup>	0.17*	57.9***	4.37 <sup>ns</sup>	0.744***	1.5***	16997.9***
6-Benzy I amynopurine (BAP)(C)		2	0.17 <sup>ns</sup>	0.38**	15.8**	0.120 <sup>ns</sup>	0.669***	0.87***	1106.5***
$\alpha$ - Naphtalen acetic acid (D)		3	2.06***	0.46***	20.2***	1.55 <sup>ns</sup>	0.323***	0.92***	40.70 <sup>ns</sup>
AB	اثر متقابل نور و موقعیت فلس	1	1.05**	0.02 <sup>ns</sup>	17.2*	3.55 <sup>ns</sup>	0.022 <sup>ns</sup>	0.36*	122.1 <sup>ns</sup>
AC	اثر متقابل نور و BAP	2	0.24*	0.15*	3.7 <sup>ns</sup>	0.73 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	1148.0**
AD	اثر متقابل نور و $\alpha$ -NAA	3	0.54*	0.13*	5.7 <sup>ns</sup>	0.56 <sup>ns</sup>	0.064 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	242.8***
BC	اثر متقابل موقعیت فلس و BAP	2	0.170 <sup>ns</sup>	0.21*	10.7*	16.40**	0.052 <sup>ns</sup>	0.41**	485.3***
BD	اثر متقابل فلس و $\alpha$ -NAA	3	0.222*	0.14*	5.7*	3.02 <sup>ns</sup>	0.119*	0.3***	34.40 <sup>ns</sup>
CD	اثر متقابل $\alpha$ -NAA، BAP	6	0.606***	0.10 <sup>ns</sup>	8.5*	1.85 <sup>ns</sup>	0.066 <sup>ns</sup>	0.13 <sup>ns</sup>	580.18***
ABD	اثر متقابل نور، موقعیت فلس و $\alpha$ -NAA	3	0.107 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	23.0***	5.14 <sup>ns</sup>	0.024 <sup>ns</sup>	0.20*	338.80***
ABC	اثر متقابل نور، موقعیت فلس و BAP	2	1.50 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	0.24 <sup>ns</sup>	1.52 <sup>ns</sup>	0.116*	0.11 <sup>ns</sup>	359.9***
BCD	اثر متقابل موقعیت فلس، BAP، $\alpha$ -NAA	6	0.193*	0.05 <sup>ns</sup>	7.8*	2.65 <sup>ns</sup>	0.005 <sup>ns</sup>	0.32 <sup>ns</sup>	494.6***
ACD	اثر متقابل نور، BAP، $\alpha$ -NAA	6	0.176*	0.16*	1.6 <sup>ns</sup>	1.18 <sup>ns</sup>	0.055 <sup>ns</sup>	0.13*	522.4***
ABCD	اثر متقابل نور و موقعیت فلس، BAP، $\alpha$ -NAA	6	0.426***	0.29***	22.8***	1.46 <sup>ns</sup>	0.068 <sup>ns</sup>	0.28***	829**
Error	خطا	95	0.94	0.24	3.4	2.28	0.037	0.066	36.10
CV%			22.9	13.4	15.6	21.9	23.3	16.3	12.1

ns, \*, \*\* and \*\*\*: Non significant, significant at the 5, 1 and 0.1% levels of probability, respectively.

ns, \*, \*\* و \*\*\*: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح ۵، ۱ و ۰/۱٪ احتمال.

جدول ۲- اثر  $\alpha$ -NAA , BAP ، موقعیت فلس و تیمار نوری در تکثیر سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*)\*

Table 2. Effects of  $\alpha$  -NAA , BAP , scale portion and photoperiod on propagation of *Lilium ledebourii* Boiss (Duncan)\*

		میانگین Mean					
Treatments $\alpha$ - NAA(mg/L)	تیمارها	وزن کل Total weight (g)	تعداد پیازچه Number of bulblet	وزن پیازچه Weight of bulblet(mg)	درصد ریشه زایی Percentage of rooting	تعداد ریشه Number of root	درصد باززایی ریز نمونه‌ها Percentage of regeneration
0		1.07c	2.47b	117.8b	49.7b	1.77b	-
0.01		1.45a	2.86b	150.2a	55.6b	1.65b	-
0.05		1.3b	2.84b	151.7a	67.8a	2.59a	-
0.1		1.58a	3.42a	163.1a	69.6a	2.47a	-
Scale portion	موقعیت فلس						
Upper Portion	نیمه بالایی	-	2.7b	130.0b	52.6b	1.79b	38.5b
Lower portion	نیمه پائینی	-	3.0a	160.0a	68.5a	2.45a	60.3a
BAP (mg/l)							
0		-	3.2a	131.0b	54.9a	2.44a	54.9a
0.01		-	2.7b	145.0ab	47.8b	2.18a	47.8b
0.1		-	2.68b	161.0a	45.7b	1.75b	45.7b
Photoperiod	تیمار نوری						
Light	روشنایی	-	3.3a	135b	51.9b	1.95b	69.2a
Dark	تاریکی	-	2.48b	155a	69.2a	2.29a	52.7b

\* Mean followed by the same letters are not significantly different (Duncan 5%).

\* علائم یکسان دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ نیستند.

جدول ۳ - اثرات متقابل تیمار نوری، محل تهیه ریز نمونه و سطوح مختلف BAP و NAA بر روی تکثیر سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*)  
 Table 3. Interactions of light treatment, scale portion, BAP and NAA on propagation of *Lilium ledebourii* Boiss (Duncan)

Mean میانگین							
تیمارها Treatments	وزن کل Total weight (g)	تعداد پیازچه Number of bulblet	وزن پیازچه Weight of bulblet (mg)	قطر پیازچه Diameter of bulblet(mm)	تعداد ریشه Number of root	درصد باززایی ریز نمونه‌ها Percentage of regeneration	
A <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	1.48 a	4.4 a					
A <sub>2</sub> C <sub>1</sub>						59 a	
A <sub>1</sub> D <sub>4</sub>	1.67 a	4.30 a				55.5 a	
A <sub>2</sub> D <sub>4</sub>							
B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>					2.41 a	66.3 a	
B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>		3.47 a			2.50 a		
B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>			161 a		2.52 a		
B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>			182 a	8.49 a	2.31 a		
B <sub>1</sub> D <sub>4</sub>		3.50 a				58.2 a	
B <sub>2</sub> D <sub>1</sub>						63.2 a	
B <sub>2</sub> D <sub>2</sub>						57.9 a	
B <sub>2</sub> D <sub>3</sub>						61.3 a	
B <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	1.65 a	3.54 a				71.2 a	
B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>							
B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub>	1.78 a		228 a				
B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>	1.75 a						
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>4</sub>	2.22 a	5.34 a					
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>	2.22 a						
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>4</sub>		5.27 a					
A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> D <sub>2</sub>			291 a				
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub>					3.92 a	91 a	
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>4</sub>			302 a		4 a		
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>3</sub>			286 a				
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> D <sub>4</sub>					3.97 a		
		تیمار شاهد	C1: control تیمار شاهد		D1: control تیمار روشنایی	Lightness	A1:
			D2: 0.01 mg l-1 NAA		C2: 0.01 mg l-1 BAP تیمار تاریکی	Darkness	A2:
		D3: 0.05 mg l-1 NAA	C3: 0. 1 mg l-1 BAP		ریز نمونه‌های نیمه بالایی فلس	Upper portin of bulblet	B1:
				D4: 0. 1 mg l-1 NAA	ریز نمونه‌های نیمه پایینی فلس	Lower portin of bulblet	B2:



شکل ۱- پیازچه‌های حاصل از کشت بافت ریز نمونه‌های فلسی در غلظت ۰/۱ نفتالن استیک اسید

Fig. 1. Effect of 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA on number of bulblet of scale explant



شکل ۲- پیازچه‌های حاصل از کشت بافت ریز نمونه‌های فلسی در روشنایی

Fig. 2. Effect of lightness on number of bulblet of scale explant



شکل ۳- پیازچه‌های حاصل از کشت بافت ریز نمونه‌های فلسی در تاریکی

Fig. 3. Effect of darkness on number of bulblet

وزن کل و قطر پیازچه اختلاف معنی‌داری (P=۰/۰۵) در  
تعداد پیازچه و اختلاف بسیار معنی‌داری را  
(P = ۰/۰۰۱) در صفاتی چون وزن پیازچه ، درصد

محیط کشت چون دما و نور باشند.  
تجزیه واریانس اثر محل تهیه ریز نمونه از بخش‌های  
بالایی یا پایینی فلس نشان داد به جز در صفاتی چون

گلابیل در روشنائی بیشتر از تاریکی بود (Danto and Bhojwani, 1995). وزن پیازچه‌های حاصل از تیمار تاریکی نیز نسبت به تیمار روشنائی بیشتر بود که با توجه به رقابت پیازچه‌ها به منظور دسترسی بهتر و بیشتر به مواد غذایی قابل بررسی است و بنابراین پیازچه‌های باززایی شده در تاریکی وزن بیشتری داشتند که با گزارش‌های سایرین (Niimi 1985; Maesato et al., 1994) مطابقت دارد.

اثر متقابل نور و محل تهیه ریز نمونه بر روی وزن کل، وزن پیازچه و تعداد ریشه معنی دار بوده است و واکنش تیمار نوری بستگی به موقعیت فلس در صفات ذکر شده دارد به طوری که تیمار روشنائی و ریز نمونه پایینی فلس حداکثر وزن کل (۱/۵۶g) تیمار تاریکی و ریز نمونه نیمه بالایی فلس حداکثر وزن پیازچه (۱۷۹/۷g) و تعداد ریشه را (۲/۷۸) داشته‌اند گرچه تعداد ریشه با تیمار روشنائی و نیمه بالایی فلس در سطح ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی داری ندارند (جدول ۱).

اثر متقابل نور و تیمار BAP بر وزن کل، تعداد پیازچه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها معنی دار بوده است (جدول ۲) و واکنش تیمار نوری بستگی به تیمار BAP در صفات ذکر شده دارد به طوری که تیمار روشنائی و کنترل حداکثر وزن کل (۱/۴۸ گرم) تعداد پیازچه (۴/۴) و تیمار تاریکی و شاهد ماکزیمم درصد باززایی (۵۹) را نشان داده است (جدول ۳).

اثر متقابل نور و تیمار NAA بر وزن کل، تعداد پیازچه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها معنی دار بوده است (جدول ۲) و واکنش تیمار نوری بستگی به تیمار NAA در صفات ذکر شده دارد به طوری که تیمار روشنائی و NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حداکثر وزن کل (۱/۶۷g) و تعداد پیازچه (۴/۳۰) در حالی که همان غلظت NAA در تیمار تاریکی حداکثر درصد باززایی را (۵۵/۵) نشان داده است (جدول ۳).

اثر متقابل موقعیت فلس و BAP نیز بر تعداد پیازچه، وزن پیازچه، قطر پیازچه، تعداد ریشه و درصد باززایی

ریشه‌زایی، تعداد ریشه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها شاهد بودیم. حداکثر تعداد پیازچه، وزن پیازچه، درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و درصد باززایی در نیمه پایینی فلس حداکثر و حداقل در نیمه بالایی فلس است (جدول ۲). این تفاوت‌ها می‌تواند نشانگر تفاوت نسبت مواد غذایی و هورمونی در قسمت‌های مختلف فلس باشد. احتمالاً سرعت و میزان تقسیم سلولی نیز در نیمه پایین از نیمه بالایی فلس بیشتر است.

شدت، تناوب و کیفیت نور می‌تواند اثرات مختلفی را بر روی ریز نمونه بگذارد. اثر تیمار نوری بر وزن کل بیانگر اختلاف معنی دار در بین دو تیمار بود و در تیمار روشنائی تعداد پیازچه و درصد باززایی ماکزیمم گرچه تیمار تاریکی حداکثر وزن پیازچه، درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه را نشان داده است (جدول ۲). به نظر می‌رسد تولید پینه و پیازچه بیشتر در تیمار روشنائی منجر به افزایش وزن کل گردیده است. انکوباسیون در روشنائی به طور مشخصی سبب افزایش تولید پیازچه از هر فلس گردید احتمالاً شدت نور پایین با تأثیر بر روی میزان IAA داخلی سبب تولید بیشتر پیازچه می‌گردد هم چنین ممکن است نور متناوب (۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی) برای فعالیت فیتو کروم مناسب تر باشد و با تغییر در نسبت (Pfr/pt) بر تعادل هورمون‌های داخلی و نفوذپذیری سلول‌ها اثر کرده و سبب افزایش تعداد پیازچه گردد (شکل‌های ۲ و ۳).

نتایج این آزمایش با نتایج اغلب پژوهشگران مطابقت دارد. در بررسی‌های بر روی گونه *L. rubellum* تیمار نوری بخصوص نور مداوم سبب افزایش مقدار پیازچه گردید (Niimi, 1995). در حالی که استیمات و آشر (Stimart and Asher, 1978) نتایج متناقضی را مبنی بر استفاده از نور به دست آوردند که ظاهراً این امر به گونه سوسن بستگی دارد

در گونه *L. longiflorum* نیز تعداد پیازچه بیشتری در تیمار روشنائی نسبت به تاریکی به دست آمد (Van Lee et al., 1999). هم چنین تشکیل پداژک در

حد اکثر درصد باززایی (۶۰/۵) را نشان داده‌اند (جدول ۳).

اثر متقابل نور، موقعیت فلس، NAA بر روی وزن پیازچه، تعداد ریشه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها معنی دار بوده است (جدول ۲) به طوری که تیمار تاریکی و ریز نمونه‌های نیمه پایینی فلس و NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حد اکثر وزن پیازچه ( $239/4 \text{ mg}$ )، تعداد ریشه (۳/۵) و درصد باززایی (۶۵) را نشان داده است. گرچه با تیمار تاریکی و نیمه پایینی فلس و NAA با غلظت  $0.05$  یکسان (۳/۴) و درصد باززایی در همین تیمار نیز ۶۳ درصد است که همین تیمار با NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  (۶۵ درصد) در باززایی اختلاف ندارد (جدول ۳).

اثر متقابل نور، موقعیت فلس و BAP بر روی درصد ریشه‌زایی و باززایی معنی دار بوده است (جدول ۲) به طوری که تیمار تاریکی و ریز نمونه نیمه بالایی فلس و تیمار شاهد حد اکثر ریشه زایی (۸۰/۹٪) و باززایی (۷۳/۵٪) را نشان داده است (جدول ۳).

اثر متقابل نور، BAP، NAA بر روی وزن کل، تعداد پیازچه، تعداد ریشه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها معنی دار بوده است (جدول ۲). تیمار تاریکی و BAP با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  و NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حد اکثر وزن کل (۱/۸۹) را نشان داده و تیمار روشنایی بدون BAP و NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حد اکثر تعداد پیازچه (۵/۳۵) و تعداد ریشه (۳/۱۵) را داشته، گرچه تعداد ریشه در تیمار روشنایی با غلظت صفر BAP و NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حد اکثر تعداد ریشه را (۳/۱۵) نشان داده است. تیمار روشنایی و BAP، NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حد اکثر درصد باززایی (۶۷) را نشان داده‌اند (جدول ۳).

اثر متقابل موقعیت فلس، NAA و BAP بر روی وزن کل، وزن پیازچه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها معنی دار بوده است (جدول ۲) به طوری که نیمه بالایی فلس در غلظت‌های صفر و BAP و NAA به غلظت  $0.1$

معنی دار بوده است (جدول ۲) و واکنش محل تهیه ریز نمونه بستگی به تیمار BAP در صفات ذکر شده دارد به طوری که ریز نمونه پایینی فلس و تیمار شاهد حد اکثر تعداد پیازچه (۳/۴۷) و درصد باززایی (۶۶/۳) را نشان داده در حالی که همان تیمار ریز نمونه با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP حد اکثر وزن ( $182/3 \text{ mg}$ ) و قطر پیازچه ( $8/49 \text{ mm}$ ) را نشان داده است.

تیمار نیمه پایینی فلس و BAP با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  و  $0.01$  ( $161 \text{ mg}$ ) ( $182 \text{ mg}$ ) در سطح ۵٪ (آزمون دانکن) بر روی وزن پیازچه یکسان هستند و تعداد ریشه نیز در نیمه پایینی فلس و BAP با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حد اکثر (۲/۵۲) است. گرچه همین موقعیت ریز نمونه با BAP غلظت‌های  $0.1$  و  $0.01$  ( $2/41$ ) ( $2/31$ ) در سطح ۵٪ (آزمون دانکن) یکسان هستند. (جدول ۳).

اثر متقابل محل تهیه ریز نمونه و تیمار NAA بر وزن کل، تعداد پیازچه، وزن پیازچه درصد ریشه زایی و تعداد ریشه معنی دار بوده است (جدول ۲) و واکنش محل تهیه ریز نمونه بستگی به NAA دارد. نیمه پایینی فلس و غلظت  $0.1$  میلی‌گرم در لیتر حد اکثر وزن کل ( $1/65 \text{ g}$ ) و تعداد پیازچه (۳/۵۴) را نشان داده، گرچه با نیمه بالایی فلس و غلظت  $0.1$  NAA (۳/۵) در سطح ۵٪ (آزمون دانکن) در تعداد پیازچه تفاوت معنی داری ندارند. درصد باززایی در نیمه پایینی فلس و NAA با غلظت  $0.1$  حد اکثر (۶۳/۲) می‌باشد گرچه با سایر غلظت‌های  $0.1$  ( $61/3$ )،  $0.05$  ( $57/9$ ) و صفر (۵۸/۲) در سطح ۵٪ یکسان هستند (جدول ۳).

اثر متقابل BAP، NAA نیز بر روی وزن کل، وزن پیازچه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها معنی دار بوده است (جدول ۲) و واکنش BAP بستگی به تیمار NAA دارد به طوری که BAP با غلظت  $0.1$  و NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  حد اکثر وزن کل ( $1/77 \text{ g}$ ) و وزن پیازچه ( $189/1 \text{ mg}$ ) را داشته‌اند گرچه با تیمار BAP با غلظت  $0.1$  و NAA با غلظت  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  در وزن پیازچه (۱۸۵/۹) اختلاف ندارد. NAA و BAP با غلظت  $0.1$

(۵/۲۷) در سطح ۰.۵٪ (آزمون دانکن) تفاوت معنی داری نداشته است.

وزن پیازچه در تیمار تاریکی و نیمه پایینی فلس و BAP به غلظت ۰/۰۱ و NAA به غلظت ۰/۱ mg l<sup>-1</sup> حداکثر (۳۰۲ mg) بوده است. گرچه با تیمارهای تاریکی و نیمه بالایی فلس و BAP به غلظت ۰/۱ و NAA با غلظت ۰/۰۱ (۲۹۱) و هم چنین تیمار تاریکی و نیمه پایینی فلس و BAP با غلظت ۰/۱ و NAA با غلظت ۰/۰۵ mg l<sup>-1</sup> (۲۸۶) در سطح ۰.۵٪ (آزمون دانکن) دارای تفاوت معنی داری نیستند.

تعداد ریشه در تیمار تاریکی و نیمه پایینی فلس و BAP با غلظت ۰/۰۱ و NAA با غلظت ۰/۱ mg l<sup>-1</sup> حداکثر (۴) و با تیمار تاریکی و نیمه پایینی فلس و BAP و NAA با غلظت ۰/۱ mg l<sup>-1</sup> (۳/۹۷) و هم چنین تیمار تاریکی و نیمه پایینی فلس و تیمار شاهد BAP و NAA با غلظت ۰/۰۵ mg l<sup>-1</sup> (۳/۹۲) در سطح ۰.۵٪ (آزمون دانکن) دارای تفاوت معنی داری نیستند.

درصد باززایی در تیمار تاریکی و ریز نمونه پایینی فلس و غلظت صفر BAP و غلظت ۰/۰۵ mg l<sup>-1</sup> NAA حداکثر (۹۱) بوده است (جدول ۳).

نیمه پایینی فلس و NAA و BAP به غلظت ۰/۱ و ۰/۰۱ حداکثر وزن کل (۱/۷۸ g) را نشان داده‌اند و حداکثر وزن پیازچه در تیمار نیمه پایینی فلس و BAP به غلظت ۰/۰۱ و NAA به غلظت ۰/۱ mg l<sup>-1</sup> حداکثر (۲۲۸ mg) بوده است.

حداکثر درصد باززایی در ریز نمونه‌های نیمه پایینی فلس و NAA و BAP با غلظت ۰/۰۱ mg l<sup>-1</sup> (۷۱/۲) است (جدول ۳).

اثر متقابل نور، موقعیت فلس، BAP، NAA بر روی وزن کل، تعداد پیازچه، وزن پیازچه، تعداد ریشه و درصد باززایی ریز نمونه‌ها معنی دار است (جدول ۲). به طوری که تیمار روشنایی و نیمه بالایی فلس و BAP با غلظت صفر و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر حداکثر وزن کل (۲/۲۲g) را نشان داده گرچه این تیمارها در سطح ۰.۵٪ (آزمون دانکن) تفاوت معنی داری با تیمارهای روشنایی، و نیمه بالایی فلس و BAP با غلظت ۰/۱ و NAA به غلظت ۰/۰۱ mg l<sup>-1</sup> ندارند.

تعداد پیازچه در تیمار روشنایی و نیمه بالایی فلس و غلظت صفر BAP و NAA به غلظت ۰/۱ mg l<sup>-1</sup> حداکثر (۵/۳۴) بوده است. گرچه این تیمارها با نیمه پایینی فلس

## References

- آزادی، پ. و ل. معینی، ۱۳۸۰. صنعت ریزازدیادی و اهمیت آن در گیاهان زینتی. چکیده مقالات اولین سمینار علمی و کاربردی گل و گیاهان زینتی ایران، نشر دفتر امور گل و گیاهان زینتی، قارچ‌های خوراکی و دارویی معاونت باغبانی جهاد کشاورزی. ص ۶۲
- هارتمن، اچ. تی، دی. ای کستر و اف. ای. دیویس، ۱۳۷۳. ازدیاد نباتات، مبانی و روش‌ها. ترجمه: خوشخوی، م. چاپ دوم، ج ۲، انتشارات دانشگاه شیراز. ۷۷۶ ص.
- قهرمان، ل. ۱۳۷۰. فلور رنگی ایران. انتشارات موسسه جنگل‌ها و مراتع. ج ۱۶ شماره ۱۹۴۴.
- Danto, P.K. and S.S. Bhojwani, 1995. *In vitro* corm formation and field evaluation of corm derived plants of gladiolus. *Scientia Horticulture*, **61**:115-129.
- De Kelerk, G., K.S., Kim, M.V. Schadewijk, and M. Gerrits. 1992. Growth of bulblets of *lilium speciosum* in vitro and soil. *Acta Horticulturae*, **325**: 513-520.
- Hannipman, E. 2000. Sustainable exploration in ornamental horticulture, an example: *Hippasastrum* (Amaryllidaceae). *Acta Horticulturae*, **541**:67-73.

- Ishioka, N. and S. Tanimoto, 1993. Changes in proteins during bulblet differentiation in *Lilium longiflorum* Bullrtin of the faculty of Agriculture , Saga Universtiy, **74**:107–113.
- Jalili, A. and Z. Jamzad, 1999. Red data book of Iran . Research Insttiute of Forests and Rangelands , Tehran , Iran. P. 748.
- Jeong , J.H., 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies . Acta Horticulturae, **414**:269– 276.
- 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. of Hort. Sci., **69(2)**:289–297.
- Marinangeli, P. and N. Curvetto, 1997. Increased sucrose and salt concentrations in culture medium improve growth of micropropagated *Lilium* bulblets .Biocell, **21(2)**:161–164.
- Marinangeli, P. and N.Curvetti , 1998. Growth in soil of micro and macro propagated *Lilium* bulblets. Φ yton. **63(1,2)**:237–244.
- Murashig, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.***15**:473-497.
- Niimi, Y. 1985. Factor affecting the regeneration and growth of bulblets in bulb- scale culture of *Lilium rubllum* Baker.J. of the Japanese Soc. for Hort. Sci., **54(1)**:82-86.
- Niimi, Y. 1995. *In vitro* propagation and *post-in vitro* establishment of bulblets of *Lillium japonicum* Thunb. J. of Japan Soc. Hort. Sci., **63(4)**:843-852.
- Stimart, D. J and D. D. Asher. 1978. Tissue culture of bulb section for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb.Journal Am. Soc. of Hort. Sci. **103**:182-184.
- Van Aartrijk and Blom-Barnhoorn. 1981. Growth regulators requirements for adventitious from lilium bulb-scale tissue in vitro,in relation to duration of bulb storage and cultivar.Scientia Horticulturae, **14**:261-268.
- Van, Lee. B., D. T. Nhut, and K. T. Thanh-Van. 1999. Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblets explants of *Lilium longiflorum in vitro*.Plant Biology and Pathology,**322**:303-310.

## Effects of plant growth regulators NAA , BAP , different explants scale and photoperiod on tissue culture of *Lilium ledebourii* Boiss

M. Memar Moshrefi<sup>1</sup> , A. Moini<sup>2</sup> and I. Tavassolian<sup>3</sup>

### ABSTRACT

*Lilium ledebourii* Boiss is a native flower in the north of Iran, however it is an endangered species. In order to introduce and domesticate endemic plants, the first step is evaluation for propagation. One of the best and most propagation vegetative method of Lilies is in vitro scale culture using plant growth regulators in different condition. This experiment conducted using a completely randomized design (CRC) with four factors. 1- Light period at two levels: A: Lightness (16 hr light and 8 hr dark) B: darkness (24 hr dark). 2- Regional explant at two levels: A: Half distal scale, B: Half basal scale. 3- Concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) at three levels A: Zero or control B: 0.01 mg l<sup>-1</sup> C: 0.1 mg l<sup>-1</sup>. 4- Concentrations of  $\alpha$ -naphthalen acetic acid (NAA) at four level, A: Zero B: 0.01 mg l<sup>-1</sup> C: 0.05 mg l<sup>-1</sup> D: 0.1 mg l<sup>-1</sup>. Analysis of variance was performed on the collected data, and mean comparison was carried out, using Duncan's multiple range test (p<0.05). Results showed that light period increased the total weight, number of bulblets and regeneration percentage, whereas darkness treatment increased weight of bulblets and rooting percentage. Number and weight of bulblets, regeneration percentage and number of roots was better when explant obtained from basal scale. Different concentration of BAP had significant effect on some traits. The highest number of bulblets, rooting and regeneration percentage obtained in control treatment and the greatest weight of bulblets obtained by 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP and the highest number of roots obtained in control and 0.01 mg l<sup>-1</sup> BAP. Different concentration of NAA had also significant effects on some traits. The greatest total weight and number of bulblets obtained by 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA and the weight of bulblets increased in all of the NAA concentrations. Concentrations of 0.05 and 0.1 mg l<sup>-1</sup> NAA increased number of roots and rooting percentage.

**Keywords:** *Lilium ledebourii*, Tissue culture, Bulblet, Plant growth regulator, Scale portion, Photoperiod.

1,2- Assist. Profs., University of Tarbiat Modarres, Tehran, Iran.

3- Former graduate student, Tarbiat Modarres Univ. Tehran, Iran.