نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 3، پاییز 1396، ص. 482-469
شاپا: 2008 - 4730

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 469-482
ISSN: 2008 - 4730

اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی لاله واژگون *Fritillaria imperialis* L.

اسماعیل چمنی[1*] - مرضیه قمری[2] - مهدی محب الدینی[3] - علیرضا قنبری[4] - حمیدرضا حیدری[5]

تاریخ دریافت: 1393/09/05
تاریخ پذیرش: 1396/04/09

چکیده

لاله واژگون از زیباترین گل‌های زینتی و داروئی بومی ایران است، که در معرض خطر انقراض می‌باشد. در این پژوهش کالوس های لاله واژگون به عنوان ریز نمونه در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف NAA (0، 0/3 و 0/6 میلی گرم بر لیتر) در ترکیب با سه سایتوکنین BA (0، 0/3، 0/5 و 1 میلی گرم بر لیتر)، TDZ (0، 0/1، 0/3 و 0/5 میلی گرم بر لیتر) و Kin (0، 0/5، 1 و 1/5 میلی گرم بر لیتر) در قالب سه آزمایش جداگانه بر پایه طرح کاملا تصادفی کشت گردیدند. نتایج به دست آمده نشان داد که در هر سه آزمایش، در محیط کشت های حاوی 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA در ترکیب با همه غلظت های سایتوکینین ها بیشترین میزان کالوس زایی (100 درصد) به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد هر چند کالوس‌زایی در محیط‌های فاقد NAA نیز انجام گرفت، اما به منظور دستیابی به حداکثر کالوس‌زایی حضور NAA ضروری می باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در محیط های فاقد سایتوکینین در هر سه آزمایش، باززایی صورت نپذیرفت. همچنین حضور NAA در ترکیب با Kin برای باززایی ضروری می باشد و در محیط هایی که تنها حاوی Kin می باشد، هیچ گونه باززایی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، تیدیازورون، سایتوکینین، شرایط درون شیشه ای، گیاه زینتی

مقدمه

لاله واژگون[6] متعلق به خانواده لیلیاسه[7]، از گل‌های باارزش و بومی ایران می‌باشد. این گیاه از گیاهان علفی پیازدار و چند ساله است، که دارای اهمیت زینتی و داروئی است. مناطق حفاظت‌شده‌ی مانشت ایلام، گلستان‌کوه در خوانسار، ارتفاعات اشترانکوه لرستان و کوه‌های صمصامی در چهار محال و بختیاری، از مهمترین مناطق پراکنش لاله واژگون در ایران هستند (1). لاله واژگون چهارمین اثر طبیعی ملی ایران است که متأسفانه در سال‌های اخیر به‌دلیل برداشت بی‌رویه‌ی گل و پیاز و تخریب مراتع در معرض خطر انقراض قرار گرفته است. مهمترین مسئله در نجات این گیاه از انقراض و حفظ تنوع ژنتیکی ارزشمند این گیاه، به دست آوردن یک روش کار تکثیر سریع و کارآمد می‌باشد. تحقیقات پیشین نشان می‌دهند که روش‌های تکثیر سنتی مانند فلس‌برداری و تقسیم پیاز در لاله واژگون نمی‌توانند روش‌هایی کارا و مناسب برای ازدیاد این گیاه باشند (19). همچنین در روش ازدیاد جنسی و از طریق بذر تولید دانهال‌های ضعیف حاصل از بذر، کندی رشد و نمو بذر و بروز درصد بالایی از هتروزیگوسیتی استفاده از این روش ازدیاد را محدود کرده است (9). با توجه به مطالب فوق و یافته‌های بسیاری از پژوهشگران، می‌توان چنین برداشت کرد که امروزه روش‌های کلاسیک تکثیر لاله واژگون جوابگوی درخواست روز افزون این گیاه و همچنین مقابله و حفظ این گیاه از خطر انقراض نبوده و باید با روش‌های جدید جایگزین گردند. یکی از راه‌های رسیدن به این اهداف، استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی از قبیل کشت بافت می‌باشد. تکنیک‌های کشت بافت کمک می‌کند گیاهانی که از نظر اقتصادی مهم هستند با کشت مریستم، کالوس و غیره در مقیاس بالا و به صورت عاری از عوامل بیماری‌زا تکثیر شوند. در کشت بافت لاله واژگون از ریزنمونه‌های مختلف می‌توان به منظور تکثیر استفاده کرد. پیاز و فلس معمول‌ترین ریزنمونه در کشت بافت گیاهان پیازی است (22). حمیداوغلی و

1، 2، 3، 4 و 5- به ترتیب استاد، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران و دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
(*- نویسنده مسئول: (Email: echamani@uma.ac.ir
DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.38023

6- *Fritillaria imperialis* L.
7- Lilliaceae

همکاران (2) باززایی مستقیم سوخچه از کشت فلس‌های گندزدایی شده‌ی لاله واژگون در محیط MS درحضور تنظیم کننده‌های رشد ایندول استیک اسید[1]، 2-4 دی کلرو فنوکسی استیک اسید[2]، کینتین[3]، کینتین[3]، بنزیل آدنین[4] و نفتالین استیک اسید[5] را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بالاترین میزان باززایی مستقیم(33/8 عدد سوخچه)، بیشترین اندازه سوخچه(26 میلی‌متر) و بیشترین تعداد ریشه(8 عدد) در تیمار 2 میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد و در محیط کشت های حاوی بنزیل آدنین هیچ سوخچه‌ای تشکیل نشد. همچنین محمدی ده چشمه و همکاران (19) از ریزنمونه‌های جنین، گلبرگ و گل‌آذین به منظور تکثیر لاله واژگون از طریق کشت بافت از دو مسیر اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم استفاده کرد. تلاش برای به‌دست آوردن روشی مناسب و اقتصادی به منظور ریزازدیادی لاله واژگون نقش مهمی در حفظ این گیاه از خطر انقراض دارد. لذا این تحقیق با هدف بهینه سازی شرایط کشت لاله واژگون به منظور تکثیر و باززایی و بررسی اثر سطوح مختلف برخی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزنمونه کالوس انجام شد. در این پژوهش قابلیت باززایی ریزنمونه کالوس به‌دست آمده از پیاز لاله واژگون در محیط ام اس حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA، BA، TDZ و Kin مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل کالوس در گیاهان تک لپه‌ای در مقایسه با گیاهان دولپه‌ای کمتر صورت می‌گیرد (4). محققین بسیاری وجود نسبت مناسبی از اکسین و سیتوکینین را برای القای کالوس ضروری دانستند. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌ی رشد سیتوکینین در روند باززایی با توجه به نوع سیتوکینین بکار برده شده و غلظت‌های مختلف در گیاهان متفاوت است (8 و 11).

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی علوم باغبانی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. سوخ‌های لاله واژگون در آبان ماه سال 1391 از منطقه‌ی مانشت ایلام جمع آوری گردیدند و سپس به منظور گذراندن نیاز سرمایی به مدت یک ماه در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در ورمی‌کولیت مرطوب نگهداری شدند. به منظور آماده‌سازی و ضدعفونی سوخ‌ها برای کشت، ابتدا سوخ‌های لاله واژگون به خوبی با آب، اسفنج و یک قطره مایع ظرفشویی به منظور حذف گل و لای شسته شدند و سپس به مدت 1 ساعت در زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها ابتدا به مدت 1 دقیقه در الکل 70 درصد غوطه‌ور شدند. بعد از گذشت این زمان پیازها به زیر هود لامینار منتقل شده و با آب دیونیزه استریل آبکشی شدند. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به مدت 20 دقیقه در هیپوکلریت سدیم 5 درصد به همراه یک قطره توئین 20[6] ضدعفونی شدند و در مرحله‌ی آخر سه مرتبه به مدت 45 دقیقه با آب دیونیزه استریل و به منظور حذف اثر سمیت مواد ضدعفونی کننده، آبکشی شدند. هر پیازچه بسته به اندازه، به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد و در محیط کشت MS حاوی 0/8 درصد آگار و غلظت‌های مختلف NAA و 2,4-D کشت شدند. بعد از کشت، نمونه‌ها در دمای 2±25 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری 16 ساعت روشنایی (1500 لوکس از منبع نور فلورسنت) و 8 ساعت تاریکی، در اتاقک رشد قرار گرفتند. دو ماه پس از کشت، درصد کالوس‌های تشکیل شده و تعداد پیازچه اندازه-گیری شد. به منظور تکثیر و باززایی، پیازچه های تشکیل شده از ریزنمونه‌ی اولیه جدا شده و سپس به مدت یک ماه در محیط MS کشت داده شدند. سپس پیازچه ها به اندازه های نیم سانتی متری تقسیم شده و در قالب سه آزمایش جداگانه در محیط کشت MS حاوی سه غلظت NAA (0، 0/3 و 0/5 میلی گرم بر لیتر) در ترکیب با غلظت ها و انواع مختلف سایتوکینین کشت گردیدند. در آزمایش اول، محیط کشت حاوی NAA و چهار غلظت BA (0، 0/3، 0/5 و 1 میلی گرم بر لیتر)، آزمایش دوم حاوی NAA و چهار غلظت TDZ (0، 0/3، 0/5 و 1 میلی گرم بر لیتر) و آزمایش سوم حاوی NAA و چهار غلظت Kin (0، 0/5، 1و 1/5 میلی گرم بر لیتر) استفاده گردید. سپس کشت ها در اتاقک رشد با دمای 2±25 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری 16 ساعت روشنایی (1500 لوکس از منبع نور فلورسنت) و 8 ساعت تاریکی قرار داده شدند. به منظور تسریع در رشد ریز نمونه ها، کشت ها هر سه هفته یک بار واکشت شده و سه ماه پس از کشت، درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد و طول برگ و ریشه اندازه گیری شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار شامل پنج ریز نمونه) انجام پذیرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. به دلیل نرمال نبودن داده‌های مربوط به درصد کالوس‌زایی، تعداد و طول برگ و ریشه از روش‌های ناپارامتری کروسال والیس[7] و من ویتنی[8] برای تجزیه استفاده گردید.

1- Indole-3-acetic acid (IAA)
2- 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
3- Kinetin (Kin)
4- 6-***benzyladenine*** (BA)
5- 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

6- Tween 20
7- Kruskal-Wallis
8- Mann-Whitney

نتایج

آزمایش اول

تأثیرغلظت‌های مختلف NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، طول برگ، تعداد و طول ریشه لاله واژگون

با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده ها (جدول 2)، در چندین ترکیب تیماری آزمایش اول، میزان 100 درصد کالوس زایی مشاهده شده است. بهترین نتایج به منظور القای کالوس در تیمارهای صفر و یک میلی گرم بر لیتر NAA در ترکیب با یک میلی گرم BA و در هر سه غلظت BA در ترکیب با 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA به دست آمده است. از طرفی ترکیب تیماری 0/5 میلی گرم بر لیتر BA و بدون کاربرد NAA کم ترین تاثیر را بر کالوس زایی را به میزان 25 درصد داشت. این نتایج نشان داد که درصد کالوس‌زایی زمانی‌که غلظت NAA پایین و یا صفر بود، تنها در بالاترین غلظت BA به حداکثر میزان خود (100 درصد) رسید، این در حالی است که در غلظت‌های بالای NAA (0/6 میلی‌گرم در لیتر) در هر سه غلظت BA تولید کالوس با میزان 100 درصد بدست آمد. به عنوان نتیجه‌ی کلی می‌توان گفت هر چند کالوس‌زایی در محیط‌های فاقد NAA نیز انجام گرفت، اما به منظور دستیابی به حداکثر کالوس‌زایی حضور NAA لازم بود و با افزایش غلظت آن، تولید کالوس نیز افزایش می یابد. همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده از درصد کالوس‌زایی تیمار شاهد می‌توان چنین برداشت کرد که کالوس‌زایی بدون وجود اکسین و یا سایتوکینین‌ها در لاله واژگون با حداکثر میزان (100 درصد) اتفاق افتاده است. در آزمایشی چادهاری وکیو (7) گزارش کردند که در علف پنجه مرغی[1] استفاده از غلظت‌های پایین سایتوکینین (0/04 میکرومولار بنزیل آدنین) در محیط القای کالوس حاوی اکسین، تشکیل کالوس‌های جنین‌زا را افزایش داد. بررسی‌ها نشان می دهد که در محیط‌های فاقد NAA، با افزایش غلظت BA از 0/3 به 1 میلی‌گرم در لیتر، باززایی از 25 درصد به 75 درصد افزایش یافت. نتایج مشابه در تحقیق بنیان‌پور و خوشخوی (7) در تأثیر NAA و BA بر تولید شاخساره گزارش شد که باززایی در حضور BA و بدون NAA انجام شد و با افزایش غلظت BA، طول دوره‌ی باززایی کاهش یافت. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان دهنده‌ی عدم ضرورت حضور NAA به منظور باززایی است، در حالی‌که حضور BA به منظور باززایی نیاز است. هر چند نتایج نشان داد که به منظور تولید کالوس حضور نفتالین استیک اسید و بنزیل آدنین و به منظور باززایی BA ضروری است، ولی مقایسه این نتایج با تیمار شاهد نشان داد که کالوس‌زایی و باززایی بدون حضور NAA و یا BA نیز صورت گرفت و درصد آن مطابق با بهترین درصد تولید کالوس (100 درصد) و باززایی (75 درصد) ترکیب‌های تیماری NAA و BA بود. بررسی این نتایج نشان می‌دهد که درصد کالوس‌زایی و باززایی کالوس‌های لاله واژگون در تیمار شاهد قابل قبول است. همچنین نتایج همبستگی داده‌ها، همبستگی درصد باززایی را با صفات درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، میانگین طول برگ و ریشه در سطح احتمال 1 درصد و با دو صفت تعداد برگ و ریشه در سطح احتمال 5 درصد را نشان دادند (جدول 3). علاوه بر تأثیر NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی، تأثیر این هورمون‌ها همچنین بر تعداد برگ، طول برگ، تعداد و طول ریشه و تعداد پیازچه نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج جدول مقایسه میانگین مربوط به تعداد برگ نشان دادند که بیشترین تعداد برگ در تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر BA با تعداد 17 برگ مشاهده شد. بالاترین میانگین طول برگ در تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین طول 4 سانتی‌متر مشاهده شد (جدول 2). در تعیین همبستگی تعداد برگ با صفات دیگر، همبستگی تعداد برگ و قطر کالوس، طول برگ و تعداد ریشه در سطح احتمال 1 درصد و با درصد باززایی در سطح احتمال 5 درصد همبستگی را نشان داد. طول برگ نیز با قطر کالوس، تعداد برگ و ریشه همبستگی در سطح احتمال 1 درصد و با طول ریشه در سطح احتمال 5 درصد همبستگی نشان داد (جدول 3). بیشترین تعداد ریشه با تعداد 12 عدد در تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. بلندترین طول ریشه مربوط به ترکیب تیماری صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول 2). با مقایسه نتایج مربوط به میزان باززایی، تعداد برگ و تعداد ریشه می‌توان چنین برداشت کرد که تنها در ترکیب تیماری 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین تعداد برگ (17 برگ) و در نتیجه بالاترین میانگین طول برگ (4 سانتی‌متر) و بالاترین تعداد ریشه مشاهده شد، که می‌توان این نتیجه را به نقش مثبت برگ‌ها در القای ریشه‌زایی مربوط دانست. برگ‌ها دارای مقادیر بالایی از اکسین‌ها هستند که این هورمون نقش اساسی در تحریک ریشه‌زایی دارد. در بررسی همبستگی تعداد و میانگین طول ریشه نتایج به‌دست آمده نشان داد که تعداد ریشه در دو صفت تعداد و میانگین طول برگ در سطح احتمال 1 درصد و با دو صفت درصد باززایی و میانگین طول ریشه در سطح احتمال 5 درصد همبستگی داشت و میانگین طول ریشه همبستگی درسطح احتمال 1 درصد را تنها با درصد باززایی نشان داد و با درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، میانگین طول برگ و تعداد ریشه در سطح احتمال 5 درصد همبستگی داشت (جدول 3). در بحث همبستگی به دست آمده بین تعداد ریشه

1- *Cynodon dactylon*

با درصد باززایی، تعداد برگ و میانگین طول برگ می‌توان به نقش برگ‌ها به عنوان منبعی غنی از اکسین‌ها به منظور تحریک ریشه‌زایی اشاره نمود. در نتیجه با افزایش باززایی و به دنبال آن افزایش تعداد و میانگین طول برگ میزان اکسین تولید شده بالا رفته و ریشه‌زایی نیز افزایش می‌یابد.

آزمایش دوم

تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و TDZ بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد و میانگین طول برگ، تعداد ریشه و میانگین طول ریشه در لاله واژگون

نتایج آزمون تجزیه واریانس داده ها (جدول 4) نشان داد که درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در بررسی اثر NAA و TDZ بر کالوس‌زایی، تولید کالوس در تمام تیمارها مشاهده شد.

جدول 1- تجزیه واریانس تاثیرغلظت‌های مختلف ترکیب NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی لاله واژگون

Table 1- Analysis of Variance for Effect of Different Concentration of NAA and BA Combinations on Callogenesis Percentage, Calli Diameter and Regeneration Percentage in *Fritillaria imperialis* L.

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Means of Squars	
		درصد باززایی Percent of Regenaration	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter
NAA	2	6.29**	0.350*
BA	3	9.67**	0.332*
BA × NAA	6	16.89**	0.321*
اشتباه آزمایش Error	36	0.018	0.135
ضریب تغییرات (%) CV (%)	-	9.56	26.43

*و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1%

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

جدول 2- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه لاله واژگون

Table 2- Mean comparison of the effects of different concentrations of BA and NAA combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, Average length of leaf and Average length of root in *Fritillaria imperialis* L.

غلظت NAA (mg/l) NAA Concentration	غلظت BA (mg/l) BA Concentration	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس (Cm) Average of Callus Diameter	درصد باززایی Percent of Regenaration	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ (Cm) Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه (Cm) Average Length of Roots
	0	100^{a}	1.75^{ab}	75^{a}	5^{c}	2^{b}	2^{c}	0.8^{ab}
0	**0.3**	50^{b}	1^{ab}	25^{c}	1^{f}	1^{c}	0^{d}	0^{b}
	0.5	25^{c}	0.75^{b}	25^{c}	1^{f}	0.5^{d}	0^{d}	0^{b}
	1	100^{a}	2.5^{a}	75^{a}	4^{cd}	3^{ab}	5^{b}	2^{a}
	0	50^{b}	0.5^{b}	0^{d}	0^{g}	0^{e}	0^{d}	0^{b}
0.3	**0.3**	75^{a}	1.07^{ab}	0^{d}	0^{g}	0^{e}	0^{d}	0^{b}
	0.5	75^{a}	2^{ab}	75^{a}	17^{a}	4^{a}	12^{a}	0.4^{b}
	1	100^{a}	1.75^{ab}	50^{b}	2^{e}	0.7^{d}	2^{e}	0.2^{b}
	0	75^{a}	1^{ab}	0^{d}	0^{g}	0^{e}	0^{d}	0^{b}
0.6	**0.3**	100^{a}	2.5^{a}	75^{a}	8^{b}	1.7^{b}	0^{d}	0^{b}
	0.5	100^{a}	2.25^{a}	0^{d}	0^{g}	0^{e}	0^{d}	0^{b}
	1	100^{a}	2.37^{a}	75^{a}	8^{b}	1.6^{b}	0^{d}	0^{b}

میانگین‌های با حروف یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری (در سطح احتمال 5٪) با یکدیگر ندارند.

Numbers followed by the same letter in each Column are not significantly differentns

جدول 3- همبستگی بین درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه در آزمایش مربوط به غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BA در لاله واژگون

Table 3- Correlation between callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root in study of different concentrations of BA and NAA combinations

منابع تغییرات Source of Variations	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration Percent	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه Average Length of Roots
درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	1						
میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	0.529**	1					
درصد باززایی Regeneration Percent	0.431**	0.398**	1				
تعداد برگ Number of Leafs	0.061	0.443**	0.300*	1			
میانگین طول برگ Average length of Leafs	0.170	0.531**	0.468**	0.687**	1		
تعداد ریشه Number of Roots	0.076	0.066	0.330*	0.404**	0.464**	1	
میانگین طول ریشه Average Length of Roots	0.318*	0.285	0.423**	0.068	0.322*	0.329*	1

*و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1%

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

با توجه به نتایج به دست آمده از جدول مقایسه میانگین می‌توان گفت علاوه بر شاهد، بهترین تیمار برای کالوس‌زایی محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه 0/1، 0/3 و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ است. از نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA در تمامی غلظت‌های TDZ بالاترین درصد کالوس‌زایی را با میزان 100 درصد نشان دادند. همین میزان کالوس‌زایی در تیمارهای شاهد و 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ نیز به دست آمد (جدول 5). از نتایج به دست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که با افزایش غلظت NAA میزان تولید کالوس نیز افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که TDZ به تنهایی نیز قادر به تولید کالوس می‌باشد اما در ترکیب با نفتالین استیک اسید، درصد کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. کالوس‌زایی 100 درصد در تیمار شاهد نشان می‌دهد کالوس‌های لاله واژگون بدون حضور تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نیز قادر به تولید کالوس، برابر با بالاترین درصد تولید کالوس (100 درصد) در بهترین ترکیب‌های تیماری به‌دست آمده به منظور تولید کالوس هستند. نتایج حاصل از بررسی همبستگی درصد کالوس‌زایی با سایر صفات نشان داد که این صفت تنها با قطر کالوس درسطح احتمال 1 درصد همبستگی داشت (جدول 6). طبق نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل غلظت NAA و TDZ بر قطر کالوس در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار شد (جدول 4). بیشترین میانگین قطر کالوس در ترکیب تیماری 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد. تیمارهای صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ و 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ با میانگین 0/25 سانتی‌متر کوچک‌ترین قطر کالوس را داشتند (جدول 5). بررسی همبستگی میان قطر کالوس با صفات دیگر نشان داد که بین قطر کالوس با درصد کالوس‌زایی، تعداد و میانگین طول برگ همبستگی معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد وجود داشت (جدول 5). TDZ علاوه بر تحریک القای کالوس، بر باززایی کالوس‌های لاله واژگون نیز تأثیر گذار بود. تجزیه وتحلیل داده‌های باززایی نشان داد که اثر متقابل NAA و TDZ در سطح

احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 4). بهترین تیمار برای باززایی را تیمارهای شاهد و همچنین ترکیب تیماری 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و TDZ با درصد باززایی 75 درصد بودند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که در ترکیب‌های تیماری صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ، 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر TDZ، 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیترTDZ و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر TDZ هیچ گیاه باززایی شده‌ای مشاهده نشد (جدول 5). در گزارش‌های ارائه شده توسط محققین، نقش برجسته و مهم TDZ در باززایی شاخساره‌های نابجا تایید شده است (13). در این پژوهش نیز در عدم حضور TDZ هیچ گونه باززایی مشاهده نشد. نتایج نشان داد بیشترین میزان باززایی در تیمار شاهد و همچنین 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با 0/1 میلی‌گرم در لیتر TDZ با میزان 75 درصد مشاهده شد. از مقایسه این نتایج با نتایج به دست آمده از باززایی سایر تیمارها می‌توان چنین نتیجه گرفت که غلظت‌های پایین (0/3 میلی‌گرم در لیتر) TDZ در ترکیب با غلظت‌های پایین (0/1 میلی‌گرم در لیتر) TDZ مؤثرتر از غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر این دو تنظیم کننده‌ی رشد گیاهی بوده است. این نتایج را می‌توان به اثر بازدارندگی غلظت‌های بالای NAA از باززایی مربوط دانست (16). در آزمایشی باباوقلو و همکاران (3) نیز در تأثیر NAA و TDZ روی باززایی گیاه توت روباه[1] گزارش کردند که 5 میکرومولار TDZ در ترکیب با 1 میکرومولار NAA تأثیر بسیار خوبی بر باززایی و تولید شاخساره داشت، در حالی‌که ترکیب TDZ با غلظت‌های بالاتر از 1 میکرومولار NAA، منجر به عدم تولید شاخساره شد. هائو و همکاران (13) گزارش کردند که TDZ به تنهایی و یا در ترکیب با NAA می‌تواند باززایی شاخساره‌های نابجا را در گیاه عناب[2] تحریک کند. در آزمایشی دیگر هبرت و همکاران (14) روی گیاه آزالیا[3] نشان دادند که اثر متقابل تأثیر غلظت‌های TDZ و NAA در باززایی کالوس و تشکیل شاخه معنی‌دار شد. تجزیه همبستگی داده‌ها رابطه‌ی معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد را بین درصد باززایی با تعداد و میانگین طول برگ نشان داد (جدول 6). تجزیه و تحلیل داده‌های تعداد برگ، میانگین طول برگ، تعداد ریشه و میانگین طول ریشه با استفاده از روش‌های ناپارامتری انجام شدند. بهترین تیمار به منظور تولید برگ تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ با تعداد 6 برگ به همراه تیمار شاهد با تعداد 5 برگ شناخته شدند. بالاترین میانگین طول برگ نیز با 3/2 سانتی‌متر در تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده شد که با تیمار شاهد با میانگین طول برگ 2 سانتی‌متر تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول 5). در بررسی همبستگی تعداد و میانگین طول برگ با سایر صفات، همبستگی معنی‌دار مثبت بین تعداد برگ با قطر کالوس درصد باززایی و میانگین طول برگ در سطح احتمال 1 درصد مشاهده شد. همچنین میانگین طول برگ نیز با قطر کالوس، درصد باززایی و تعداد برگ همبستگی مثبت در سطح احتمال 1 درصد نشان داد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در میان غلظت‌های مختلف NAA و TDZ، ترکیب تیماری 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZ با تعداد 8 ریشه دارای بالاترین تعداد ریشه بود و در بسیاری از تیمارها ریشه‌زایی مشاهده نشد. بالاترین میانگین طول ریشه در تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه 0/5 میلی‌گرم در لیتر TDZمشاهده شد اما با تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/3 میلی‌گرم در لیتر TDZ با میانگین طول ریشه 1/6 سانتی‌متر تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج همبستگی تعداد و میانگین طول ریشه نیز نشان داد که تعداد ریشه و طول ریشه در سطح احتمال 1 درصد با یکدیگر همبستگی مثبت داشتند. در این آزمایش همبستگی مستقیمی بین درصد باززایی و یا تعداد برگ با تعداد و میانگین طول ریشه و نتایج به‌دست آمده در آزمایش NAA و BA مشاهده نشد (جدول 6).

بررسی نتایج مربوط به باززایی و کالوس‌زایی در هر سه ترکیب تیماری NAA و BA، NAA و Kin و NAA و TDZ نشان داد که ترکیب NAA و BA بهترین ترکیب تیماری برای القای باززایی و تولید کالوس در مقایسه با دو ترکیب دیگر بود. خرمی‌راد و همکاران (17) نشان دادند که ترکیب NAA و BA، تأثیر بهتری بر تولید شاخساره‌های آنتوریوم[4] در مقایسه با ترکیب NAA و Kin داشت. همچنین مقایسه‌ی درصد کالوس‌زایی و باززایی بین دو تیمار NAA در ترکیب با TDZ و یاKin نشان داد که محیط‌های حاوی ترکیبات NAA و TDZ درصد بالاتری از تولید کالوس و باززایی را نسبت به NAA و Kin نشان دادند. در آزمایشی اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی TDZ، بنزیل‌آمینوپورین و Kin بر تولید کالوس و باززایی گیاه سروپژیا[5] مورد بررسی قرار گرفت و نتایجی مشابه با این تحقیق به دست آمد، مشاهده شد. نتایج نشان داد که TDZ در القای کالوس مؤثر است. نتایج حاصل از تأثیر Kin روی باززایی این گیاه نشان داد که Kin توانایی اندکی در القای باززایی در مقایسه با TDZ و بنزیل آمینو پورین[6]، حتی در سطوح بالا داشت (18). در اکثر گیاهان برای کالوس‌زایی نسبت مناسبی از اکسین و سایتوکینین‌ها ضروری است. این هورمون مسئول تنظیم سنتز پروتئینی که طی تشکیل دوک

1- *Sanguisorba officinalis*
2- *Ziziphus jujuba*
3- *Rhododendron simsii*

4- *Anthurium andreanum*
5- *Ceropegia pusilla*
6- Benzylaminopurine (BAP)

سلولی در تقسیم میتوز اتفاق می‌افتد، می‌باشد. به نظر می‌رسد کالوس‌هایی که بدون نیاز به افزودن سایتوکینین به رشد و تولید کالوس در محیط کشت ادامه می‌دهند، قادر به تولید طبیعی این هورمون هستند (21). این نتایج را می‌توان با نتایج دومینو و همکاران (10) مبنی بر مشاهدات اثر تنظیمی متقابل اکسین و سایتوکینین در سطح ژن در گیاه تنباکو توجیه کرد. همچنین گلشن و همکاران (12) در گوجه فرنگی، براسیلیرو و همکاران (6) در سیب‌زمینی، هرناندس و همکاران (15) در بلوط، نیز وجود نسبت مناسبی از اکسین و سایتوکینین را برای القای کالوس ضروری دانستند. بنابراین در مجموع به نظر می‌رسد که میزان تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در تولید کالوس و باززایی لاله واژگون نیاز به تحقیق و بررسی بیشتری دارد.

جدول 4- تجزیه واریانس تاثیرغلظت‌های مختلف ترکیب NAA و TDZ بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی

Table 4- Analysis of variance for different concentration of NAA and TDZ combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Means of Squars		
		درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration (%)
NAA	2	273.43**	0.69**	246.43**
TDZ	3	243.05**	0.44**	83.24**
TDZ × NAA	6	151.91**	0.32**	206.16**
اشتباه آزمایش Error	36	0.31	0.05	0.60
ضریب تغییرات (%) CV (%)	-	2.96	17.33	8.79

**: معنی‌دار در سطح احتمال 1%

**Significant in 1% level

جدول 5- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و TDZ بر درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه

Table 5- Mean comparison of the effects of different concentrations of NAA and TDZ combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root

غلظت NAA (mg/l) NAA Concentration	غلظت TDZ (mg/l) TDZ Concentration	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس (Cm) Average of Callus Diameter	درصد باززایی Percent of Regenaration	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ (Cm) Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه (Cm) Average Length of Roots
	0	100^{a}	2^{ab}	75^{a}	5^{a}	2^{a}	2^{cd}	0.4^{e}
0	0.1	75^{b}	1.75^{ab}	50^{b}	1^{d}	0.5^{ab}	0^{f}	0^{g}
	0.3	25^{d}	0.87^{cd}	0^{d}	0^{e}	0^{b}	0^{f}	0^{g}
	0.5	75^{b}	0.25^{d}	25^{c}	4^{b}	0.5^{ab}	2^{cd}	0.2^{f}
	0	50^{c}	1.5^{ab}	0^{d}	0^{e}	0^{b}	0^{f}	0^{g}
0.3	0.1	75^{b}	0.5^{d}	75^{a}	4^{b}	0.9^{ab}	1^{e}	0.5^{d}
	0.3	25^{d}	0.75^{cd}	50^{b}	3^{bc}	0.8^{ab}	8^{a}	1.6^{ab}
	0.5	100^{a}	0.25^{d}	50^{b}	6^{a}	3.2^{a}	1^{e}	2^{a}
	0	75^{b}	2.87^{a}	0^{d}	0^{e}	0^{b}	0^{f}	0^{g}
0.6	0.1	100^{a}	1^{bc}	25^{c}	1^{d}	0.5^{ab}	0^{f}	0^{g}
	0.3	100^{a}	187^{ab}	50^{b}	1^{d}	0.6^{ab}	0^{f}	0^{g}
	0.5	100^{a}	2^{ab}	0^{d}	0^{e}	0^{b}	4^{b}	1.2^{bc}

میانگین‌هایی با حروف یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری (در سطح احتمال ٪ 1) با یکدیگر ندارند.

Numbers followed by the same letter in each Column are not significantly differentns

جدول 6- همبستگی بین درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه در غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و TDZ در لاله واژگون

Table 6-Correlation between callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root in study of different concentrations of BA and NAA combinations

منابع تغییرات Source of Variations	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration Percent	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه Average Length of Roots
درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	1						
میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	0.765**	1					
درصد باززایی Regeneration Percent	0.009**	0.064	1				
تعداد برگ Number of Leafs	0.141	0.416**	0.364*	1			
میانگین طول برگ Average length of Leafs	0.074	0.390**	0.416**	0.968**	1		
تعداد ریشه Number of Roots	- 0.173	- 0.110	0.223	0.191	0.178	1	
میانگین طول ریشه Average Length of Roots	- 0.189	0.126	0.223	0.191	0.178	0.590**	1

*و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1%

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

آزمایش سوم

تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس، درصد باززایی و تعداد برگ لاله واژگون

با توجه به نتایج تجزیه ناپارامتری کروسال والیس بین ترکیب‌های تیماری اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بهترین نتایج در تولید کالوس مربوط به تیمارهای شاهد و همچنین تیمارهای صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin، 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin، 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin، 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد و در مقابل تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin با 25 درصد تولید کالوس ضعیف‌ترین ترکیب تیماری در القای کالوس‌زایی شناخته شد (جدول 8). در بررسی میزان همبستگی نیز نتایج به‌دست آمده همبستگی مثبت و معنی‌داری بین درصد کالوس‌زایی با قطر کالوس و درصد باززایی را درسطح احتمال 5 درصد و با تعداد ریشه در سطح احتمال 1 درصد نشان داد (جدول 9). بیشترین میانگین قطر کالوس نیز مربوط به تیمار 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر Kin با قطر 2/87 سانتی‌متر به دست آمد و کوچک‌ترین کالوس‌ها نیز در تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با 0/3 میلی‌گرم در لیتر Kin و همچنین تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/3 میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (جدول 8). نتایج تجزیه همبستگی میانگین قطر کالوس با سایر صفات نشان داد که قطر کالوس با درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال 1 درصد و با میانگین طول برگ در سطح احتمال 5 درصد همبستگی داشت (جدول 9). نتایج به‌دست آمده نشان داد کاربرد غلظت‌های مختلف NAA و Kin تأثیر معنی‌داری (سطح احتمال 1 درصد) بر درصد باززایی کالوس‌های لاله واژگون داشت (جدول 7). نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین درصد باززایی در تیمارهای شاهد، 0/3 میلی‌گرم در لیترNAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin با میزان 75 درصد صورت گرفت.

در مقابل تیمارهای صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin ، صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin ، صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر Kin هیچ کالوسی وارد مرحله‌ی باززایی نشد و میزان باززایی این تیمارها برابر با صفر شد. نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که در عدم حضور NAA در هر سه غلظت 0/5، 1 و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin باززایی اتفاق نیفتاده است. در غلظت 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA با افزودن 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin میزان باززایی تا 50 درصد افزایش یافت و با بالا رفتن غلظت Kin از 0/5 به 1 میلی‌گرم در لیتر میزان باززایی به 75 درصد افزایش یافت اما با بیشتر شدن غلظت Kin تا 1/5 میلی‌گرم در لیتر میزان باززایی به 50 درصد کاهش یافت. در غلظت 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر Kin باززایی مشاهده نشد. با افزودن 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin به محیط کشت و سپس افزایش غلظت آن از 0/5 میلی‌گرم در لیتر به 1 و 1/5 میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب میزان باززایی 25، 50 و 75 درصد شد (جدول 8). نتایج مربوط به همبستگی نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد را بین درصد باززایی و تعداد و میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه نشان داد. همچنین علاوه بر روابط همبستگی فوق، رابطه‌ی همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد بین درصد باززایی با درصد کالوس‌زایی مشاهده شد (جدول 9). بالاترین تعداد برگ در تیمار شاهد با 5 برگ مشاهده شد که با تیمارهای 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد برگ نداشت. بیشترین میانگین طول برگ مربوط به تیمار 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin با میانگین 2/5 سانتی‌متر شناخته شد که با تیمار شاهد با میانگین طول برگ 2 سانتی‌متر تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول 8). این نتیجه را می‌توان به تأثیر مثبت سایتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی و در نتیجه بلندتر شدن طول برگ مربوط دانست. تجزیه داده‌های همبستگی صفات تعداد برگ و طول برگ با سایر صفات نشان داد که همبستگی مثبت بین طول برگ با سه صفت درصد باززایی، میانگین طول برگ و نیز تعداد ریشه در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود. همبستگی مثبت معنی‌داری بین میانگین طول برگ با قطر کالوس در سطح احتمال 5 درصد و با درصد باززایی، تعداد برگ و ریشه در سطح احتمال 1 درصد وجود داشت (جدول 9). هر چند نتایج حاصل از بررسی تعداد ریشه در غلظت‌های مختلف ترکیب تیماری NAA و Kin نشان داد که ترکیب تیماری 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin با تعداد 7 ریشه بالاترین تعداد ریشه را در بین سایر تیمارها داشته است اما با تیمارهای 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی‌گرم در لیتر Kin و 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی‌گرم در لیتر Kin تفاوت معنی‌داری نداشته است. این نتایج تأکیدی بر نقش مثبت NAA در تحریک آغازیدن ریشه و در مقابل نقش بازدارنده Kin در این فرآیند است. از میان تیمارهایی که ریشه‌زایی در آن‌ها صورت گرفت تیمار 0/3 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1 میلی‌گرم در لیتر Kin با میانگین طول ریشه 2/5 سانتی‌متر به عنوان بهترین ترکیب تیماری از نظر صفت طول ریشه شناخته شد که نشان دهنده‌ی نیاز کمتر گیاه به NAA در مرحله طویل شدن ریشه است (جدول 8). بررسی همبستگی بین تعداد ریشه با سایر صفات، نتایج حاصل وجود همبستگی مثبت بین تعداد ریشه و درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی و میانگین طول ریشه با معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد را نشان داد. همچنین رابطه‌ی همبستگی بین طول ریشه با صفات درصد باززایی، تعداد و میانگین طول برگ و تعداد ریشه (در سطح احتمال 1 درصد) مشاهده شد (جدول 9).

جدول 7- تجزیه واریانس تاثیرغلظت‌های مختلف NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و درصد باززایی

Table7- Analysis of variance for different concentration of NAA and Kin combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Means of Squars	
		درصد باززایی Percent of Regenaration	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter
NAA	2	16.04**	0.16ns
Kin	3	2.00**	0.08ns
Kin × NAA	6	13.07**	0.25ns
اشتباه آزمایش Error	36	0.08	0.17
ضریب تغییرات (%) CV (%)	-	11.54	31.47

ns و **: به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال 1%

ns and **: Non Significant and significant in 1% level, respectively

جدول 8- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه

Table 8-- Mean comparison of the effects of different concentrations of NAA and Kin combinations on callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root

غلظت NAA (mg/l) NAA Concentration	غلظت (mg/l)Kin Kin Concentration	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس (Cm) Average of Callus Diameter	درصد باززایی Percent of Regenaration	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ (Cm) Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه (Cm) Average Length of Roots
0	0	100^{a}	7.5^{a}	75^{a}	5^{a}	2^{a}	2^{b}	1^{b}
	0.5	25^{d}	3b^{c}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
	1	50^{c}	3.5^{bc}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
	1.5	100^{a}	7.^{5a}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	1^{c}	0.2^{c}
0.3	0	75^{b}	2^{bc}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
	0.5	75^{b}	7^{a}	50^{b}	2^{b}	0.7^{ab}	5^{a}	1^{b}
	1	50^{c}	3^{bc}	75^{a}	3^{ab}	1.2^{ab}	3^{ab}	2.5^{a}
	1.5	100^{a}	4.5^{ab}	50^{b}	1^{c}	0.5^{ab}	1^{c}	1^{b}
0.6	0	75^{b}	4^{b}	0^{d}	0^{d}	0^{b}	0^{d}	0^{d}
	0.5	100^{a}	6.5^{ab}	25^{c}	1^{c}	0.5^{ab}	0^{d}	0^{d}
	1	100^{a}	7.5^{a}	50^{d}	1^{c}	0.7^{ab}	7^{a}	1^{b}
	1.5	100^{a}	7^{a}	75^{a}	3^{ab}	2.5^{a}	4^{a}	0.2^{c}

میانگین‌هایی با حروف یکسان در هر ستون اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری(در سطح احتمال ٪ 1) با یکدیگر ندارند.

Numbers followed by the same letter in each Column are not significantly differentns

جدول 9- همبستگی بین درصد کالوس‌زایی، میانگین قطر کالوس، درصد باززایی، تعداد برگ، میانگین طول برگ و تعداد و میانگین طول ریشه در غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و Kin در لاله واژگون

Table 9- Correlation between callogenesis percentage, Calli Diameter and regeneration percentage, leaf number, mean length of leaf and mean length of root in study of different concentrations of Kin and NAA combinations

منابع تغییرات Source of Variations	درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	درصد باززایی Regeneration Percent	تعداد برگ Number of Leafs	میانگین طول برگ Average length of Leafs	تعداد ریشه Number of Roots	میانگین طول ریشه Average Length of Roots
درصد کالوس زایی Callus Induction (%)	1						
میانگین قطر کالوس Average of Callus Diameter	0.307**	1					
درصد باززایی Regeneration Percent	0.314**	0.064	1				
تعداد برگ Number of Leafs	0.101	0.172	0.525**	1			
میانگین طول برگ Average length of Leafs	0.221	0.360*	0.711**	0.676**	1		
تعداد ریشه Number of Roots	0.418**	0.098	0.399**	0.013	0.100	1	
میانگین طول ریشه Average Length of Roots	0.031	0.088	0.552**	0.401**	0.370**	0.435**	1

*و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1%

* and ** Significant in 1% and 5% level, respectively

در بررسی تأثیر هورمون‌های NAA و Kin بر درصد کالوس‌زایی، باززایی و قطر کالوس ضرورت حضور NAA در محیط‌های حاوی Kin به منظور باززایی مشاهده شد. بررسی اثر تیمارهای NAA و Kin در مقایسه با تیمار NAA و BA نشان داد که میانگین درصد کالوس‌زایی و باززایی در تیمار NAA و BA کمی بالاتر از این میزان در تیمار NAA و Kin بود.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده از سه آزمایش فوق، مشخص می گردد که بین ترکیب های هورمونی مختلف NAA با انواع سایتوکینین ها، بر شاخص درصد کالوس زایی، تفاوتی مشاهده نمی گردد، به طوری که در هر سه آزمایش، در محیط های حاوی 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA به همراه تمام غلظت های سایتوکینین ها، بیشترین میزان کالوس زایی (100 درصد) مشاهده شده است. البته لازم به ذکر است که هرچند در محیط کشت های فاقد تنظیم کننده رشد، شاهد تولید کالوس می باشیم اما برای رسیدن به حداکثر تولید کالوس نیاز به افزودن NAA به عنوان یک اکسین به محیط کشت داریم. در زمینه شاخص قطر کالوس، نتایج به دست آمده از سه آزمایش نشان می دهد که بیشترین قطر کالوس به دست آمده در آزمایش اول و دوم به ترتیب 2/5 سانتی متر (در تیمارهای صفر میلی گرم بر لیتر NAA + یک میلی گرم بر لیتر BA و 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA + 0/3 میلی گرم بر لیتر BA) و 2/87 سانتی متر (0/3 میلی گرم بر لیتر NAA + صفر میلی گرم بر لیتر TDZ) اختلافی نداشتند اما در آزمایش سوم، بیشترین قطر کالوس 7/5 سانتی متر در محیط حاوی 0/6 میلی گرم بر لیتر NAA به همراه یک میلی گرم بر لیتر Kin به دست آمد که نسبت به سه آزمایش دیگر بیشتر بود. با توجه به این نتایج می توان ترکیب هورمونی NAA و Kin را بهترین تیمار هورمونی برای کالوس زایی در لاله واژگون دانست. با توجه به نتایج به دست آمده وجود یک سایتوکینین برای باززایی گیاهچه از کالوس ها ضروری می باشد و در هر سه ازمایش در محیط های فاقد سایتوکینین، باززایی صورت نپذیرفت. همچنین کینتین تنها در حضور NAA قادر به باززایی می باشد ولی BA و TDZ به تنهایی نیز می توانند سبب باززایی گیاهچه گردند. بر اساس نتایج این پژوهش، بهترین محیط برای باززایی از کالوس محیط کشت حاوی مقادیر پایین NAA (0/3 میلی گرم بر لیتر) به همراه TDZ (0/1 میلی گرم بر لیتر) است.

سپاسگزاری

این پژوهش با اعتبارات و امکانات گروه علوم باغبانی دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی به اجرا در آمده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Eslam Zade N., Hosseini S.M., and Moradi H.R. 2010. The Study of *Fritillaria imperialis* Site by Ellenberg Table. Journal of Sciences and Techniques in Natural Resources, 1:83-93 (In Persian with English abstract).
2- Hamidoughlou S. 2011. Study on explant types and plant growth regulators on in vitro propagation of *Fritillaria imperialis* L.. MS Thesis, University of Mohaghegh Ardabili.
3- Babaoglu M., and Yorgancilar M. 2000. TDZ-specific plant regeneration in Salad Burnet. Plant Cell Plant Cell Tissue Organ Culture, 440: 31–34.
4- Bagheri A., and Saffari M. 2009. *in vitro* culture of higher plants. Ferdowsi University of Mashhad, 406.
5- Bonyanpour A., and Khosh-Khui M. 2013. Callus Induction and Plant Regeneration in *Punica granatum* L. 'Nana' from Leaf Explants. Journal of Central European Agriculture, 14: 75-83.
6- Brasileiro A.C.R., Willadino L., Carvalheira G.G., and Guerra M. 1999. Callus induction and plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. IPA 5) via anther culture. Ciencia Rural, 29: 619-623.
7- Chaudhury A., and Qu R. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell Tissue Organ Culture, 60: 113-120.
8- Chengalrayan K., and Gallo-Meagher M. 2001. Effect of various growth regulators on shoot regeneration of Sugarcane. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 37: 434-439.
9- De Hertogh A., and Lenard M. 1993. The Physiology of Flower Bulbs.
10- Dominov J.A., Stenzler L., Lee S., Schwarz J.J., Leisner S., and Howell S.H. 1992. Cytokinins and Auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. Plant cell, 4: 451-461.
11- Fratini R., and Ruiz M.L. 2002. Comparative study of different Cytokinins in the induction of morphogenesis in Lentil (*Lens culinaris* Medik.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 38: 46-51.
12- Gulshan T.M., Varghese D.R., and Sharma D.R. 1981. Studies on anther cultures of Tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. Biologia Plantarum, 23: 414-420.

13- Hao Z., Dai D., Wang J., Wu X., and Liu M. 2013. Callus induction and plant regeneration from anther walls in *Ziziphus jujuba* Mill. Journal of Food, Agriculture and Environment, 11: 405 – 409.
14- Hebert J., Touchell V., Ranney R., and LeBude V. 2010. In Vitro Shoot Regeneration and Polyploid Induction of *Rhododendron Fragrantissimum* Improved'. Hortscience, 45: 801–804.
15- Hernandez L., Celestino C., and Toribio M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 21: 759-764.
16- Hutchinson M. J., Onamu R., Kipkosgei L., and Obukosia D. 2010. Effect of Thidiazuron, NAA and BAP on in vitro Propagation of *Alstroemeria aurantiaca* cv. 'Rosita' from shoot tip explants. Journal of Agriculture and Crop Sciences, 12: 60-68.
17- Khorrami Raad M., Bohluli Zanjani S., Shoor M., Hamidoghli Y., Ramezani sayyadd A., Kharabian-Masouleh A., and Kaviani B. 2012. Callus induction and organogenesis capacity from lamina and petiole explants of *Anthurium andreanum* Linden (Casino and Antadra). Agriculture and Crop Science, 6: 928-937.
18- Kondamudi R., Vijayalakshmi V., and Sri Rama Murthy K. 2010. Induction of Morphogenetic Callus and Multiple Shoot Regeneration in *Ceropegia pusilla* Wight and Arn. Biotechnology, 9: 141-148.
19- Mohammadi Dehcheshme M., Khalighi A., and Naderi R. 2007. Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 1875- 1879.
20- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-479.
21- Sunderland N., and Wells B. 1968. Plastid structure and development in green callus tissues of *Oxalis dispar*. Annals of Botany, 32: 327-346.
22- Witomska M., and Lukaszewska A. 1997. Bulblet regeneration *in vitro* from different explants of *Fritillaria imperialis*. Acta Horticulturae, 430:331–338.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 469-482
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 3، پاییز 1396، ص. 482-469
شاپا: 2008 - 4730

Effect of Plant Growth Regulators on Callogenesis and Regeneration Of *Fritillaria imperialis* L.

Es. Chamani[1*]- M. Ghamari[2]- M. Mohebodini[3]- A.R. Ghanbari[4]- H.R. Heydari[5]

Received: 26-11-2016
Accepted: 30-06-2017

Introduction: Crown imperial (*Fritillariaimperialis* L.) is an ornamental and medicinal plant native to mountainous regions of Iran. This plant genetic resources is in danger of extinction, because of grazing livestock and pest outbreaks. However, due to slow reproduction in natural conditions and traditional multiplication methods such as scaling and Bulb division, many species of this genus are endangered. Using of biotechnology, namely in vitro plant propagation, is a solution to the problems of reproduction of rare and endangered plant species with difficult propagation and mass production of valuable genotypes. Therefore, micropropagation of *F. imperialis* through in vitro regeneration is essential for conservation and commercial production.

Material and Methods: The bulbs of *F. imperialis* in dormancy stage obtained from Ilam mountainous regions in Iran and theywere placed in wet vermiculite at 4 °C for 4-6 weeks. Then, Bulbs were surface-sterilized with 70% ethanol for 60s followed by immersion in 5% (v/v) NaOCl solution for 20min with gentle agitation, and they rinsed three times in sterile double distilled water. Explants prepared from the lower third of scales with basal plate and were placed in MS basal medium supplemented with different concentrations of NAA and 2,4-D for callus induction. Test tubes with bulb segments were maintained within 25±2°C in growth chamber at 16 hours light period by the illumination from white florescent tube light and 8 hours dark. After two months callus were transferred to MS basal medium without PGRs. Then, callus excised to 0.5 cm pieces and were transferred to MS basal medium supplemented with NAA in 0, 0.3 and 1 mg/l concentration.Three types of cytokinins with different concentrations were arranged in three seperated experiments. Thefirst experiment medium contained NAA with BA (0, 0.3, 0.5 and 1 mg/l), the second experiment NAA combined with 0, 0.1, 0.3 and 0.5 mg/l TDZ and the third experiment MS basal medium included NAA with Kin (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l). After three months, percentage of callogenesis, diameter of calli, percentage of regeneration, number of leaves and roots and length of leaves and roots were measured. This experiment were carried out in completely randomized design with 4 replications.

Results and Discussion: In the first experiment application of NAA and BA on in-vitro multiplication of *F. imperialis* were evaluated. Highest callogenesis and formation (100 %) was observed in mediums contained 0.3 mg/l NAA + 1 mg/l BA, 0.6 mg/l NAA + (0.3, 0.5 and 1 mg/l) BA. Also, callogenesis was obtained in medium contained 0.5 mg/l BA without NAA. This result showed that only in medium supplemented with 1 mg/l BA provided highest (100%) callogenesis, when NAA concentrations were low. However, high levels of NAA (0.6 mg/l) in all concentrations of BA were obtained maximum callogenesis. We concluded that NAA is essential for callogenesis and enhancing its levels can increase callogenesis. Also, application of low levels of BA (0.4 µM) in callogenesis mediums of *Cynodon dactylon* contained Auxins resulted in increment of embryogenetic calli formation. In the other hand, presence of BA is essential for plantlet regeneration, however NAA is not necessary. Plantlet regeneration was obtained in PGRs free medium. Statistical analysis of results showed that different concentrations of BA and NAA had significant effects on percentage of callogenesis, diameter of calli, percentage of regeneration, length of leaves and roots ($P<0.01$) and number of leaves and roots ($P<0.05$). Mean comparison showed that maximum number of leaves (17 leaf in each treatment) and length of leaves (4cm) obtained in media supplemented with 0.3 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA. Correlation between the number of leaves and other traits such as diameter of callus and length of leaves ($P<0.01$) and regeneration ($P<0.05$) was significant.

In the second experiment, application of NAA and TDZ on in-vitro multiplication of *F. imperialis* were evaluated. Analysis of variance showed that maximum callogenesis obtained in medium supplemented with 0.3 mg/l NAA + 0.5 mg/l TDZ and 0.6 mg/l NAA in all TDZ levels (0.1, 0.3 and 0.5 mg/l). The combination of 0.6 mg/l NAA with all concentrations of TDZ resulted in maximum (100 %) callogenesis. Highest diameter of calli was obtained in medium contained 0.6 mg/l NAA without TDZ. Best plantlet regeneration was observed in

1, 2, 3, 4 and 5- Professor, Grajuated MSc Student, Associate Professors and Ph.D Student, Department of Horticultral Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Respectively
(*-Corresponding Author Email: echamani@uma.ac.ir)

media contained 0.3 mg/l NAA + 0.3 mg/l TDZ.

In the third experiment, application of NAA and Kin on in-vitro multiplication of *F. imperialis* were evaluated. Statistical analysis showed the highest callogenesis in medium supplemented with 1.5 mg/l Kin, 0.3 mg/l NAA + 1.5 mg/l Kin, 0.6 mg/l NAA + 0.5 mg/l Kin, 0.6 mg/l NAA + 1 mg/l Kin, 0.6 mg/l NAA + 1.5 mg/l Kin.

Conclusion: The results of this study show the similarity of callus proliferation in all experiments. In all experiments, medium supplemented with 0.6 mg/l NAA plus all cytokinin concentrations showed the highest rate of callogenesis. The highest callus diameter (7.5 cm) was obtained in third experiment (0.6 mg/l NAA + 1 mg/l Kin), while callus diameter in the first (1 mg/l BA and 0.6 mg/l NAA + 0.3 mg/l BA) and the second (0.3 mg/l NAA) experiments was measured 2.5 and 2.87 cm, respectively. Regeneration results indicated that Cytokinin is necessary for plantlet regeneration. Plant regeneration occurred only in medium contained both of kin and NAA, while BA and TDZ could regenerate plantlets from Callus independent of NAA presence.

Keywords: BA, Cytokinin, in vitro Condition, Ornamental Plant, TDZ