نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، ص. ۷۸-۶۸
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 29, No. 1, Spring 2015, P. 68-78
ISSN: 2008 - 4730

تأثیر هورمون‌های رشد بر باززایی درون شیشه‌ای زنبق مردابی (*Iris pseudacorus*)

اسماعیل چمنی[1*] - مبینا طاهری[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۹

چکیده

به‌منظور انجام این طرح، سه آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. برای باززایی گیاه از بذر، از غلظت‌های مختلف NaOH (۵، ۱۰، ۱۵و۲۰ مولار) و خراش‌دهی با کاغذ سمباده (خراش‌دهی نرم، خراش‌دهی متوسط و خراش‌دهی سخت) استفاده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که غلظت ۲۰ مولار NaOH و نیز خراش‌دهی سخت با کاغذ سمباده بیشترین میزان جوانه‌زنی را داشتند. دو ماه پس از جوانه‌زنی بذور، هیپوکوتیل حاصل از دانهال‌های بذری طی دو آزمایش جداگانه تیمار شدند که در آزمایش اول غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های اکسین (پیکلرام و 2,4-D) و در آزمایش دوم غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر سایتوکینین (TDZ و BA) با ۴ تکرار برای هر تیمار، در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارها در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها در پارامترهای رشد کالوس نشان داد که غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر پیکلرام و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تأثیر را بر القای کالوس در این گیاه داشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها در پارامترهای رشد گیاهچه نشان داد که تیمار BA با غلظت۱ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان شاخه‌زایی را در این گیاه تولید نمود.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، خراش‌دهی، زنبق مردابی، کشت بافت

مقدمه

زنبق بزرگ‌ترین جنس تیره Iridaceae است که شامل بیش از ۳۰۰ گونه از گیاهان گل‌دار می‌باشد. این گیاهان معمولاً در باغ‌ها و فضای سبز کشت و کار می‌شوند و از گل‌های آنها برای اهداف زینتی استفاده می‌شود. زنبق مردابی بومی اروپا، آسیای شرقی و شمال غربی آفریقاست (۴۲)، و به راحتی توسط گل‌هایش قابل تشخیص است چون تنها گونه زنبق وحشی با گل‌های زرد است. زنبق مردابی نزدیک زمین‌های خیس مانند مرداب‌ها یا باتلاق‌ها رشد می‌کند و به غرقاب، pH پایین و خاک‌هایی با کمبود اکسیژن مقاوم است. از این گیاه در فضای سبز و باغچه‌ها، حاشیه آب نماها، مرداب‌ها و حوضچه‌ها استفاده می‌شود (۳۴).

گونه‌های زنبق از طریق رویشی توسط پیاز یا ریزوم تکثیر می‌شوند. بیشتر زنبق‌های پیازدار در هر سال بیشتر از ۵ پیاز دختری تولید نمی‌کنند و ۴ تا ۵ سال برای به‌دست آوردن گیاهچه به تعداد کافی از گیاه مادری زمان لازم است (۷)، در زنبق‌های ریزوم‌دار نیز تکثیر از طریق ریزوم بسیار کند است و سبب تولید تعداد کمی از گیاهان می‌شود (۲ تا ۱۰ گیاه از هر ریزوم در سال)، بنابراین چندین سال برای تولید تجاری یک رقم جدید زمان لازم است (۳۷). ازدیاد جنسی، به‌وسیله بذر صورت می‌گیرد. مزیت عمده این روش تولید گیاهان عاری از ویروس و امکان کاشت آن‌ها در زمان‌های مختلف سال می‌باشد (۲۰).

زنبق مردابی از طریق تقسیم ریزوم تکثیر می‌شود که بیش از ۱۰ گیاه از هر ریزوم ایجاد نمی‌شود (۲۰). الگوی جوانه‌زنی بذر این رقم مشابه سایر گونه‌های زنبق و هیبریدهای آن‌هاست که خواب بذر به مدت چند ماه از جوانه‌زنی آن جلوگیری می‌کند (۳۹). هم‌چنین جنین‌ها پتانسیل رشد کمی دارند و توانایی غلبه بر مقاومت مکانیکی پوشش‌های احاطه کننده خود را ندارند و سرعت جوانه‌زنی بذرها نیز کم است (۲۶). از این‌رو نیاز به ایجاد یک روش مناسب و مؤثر رای تکثیر زنبق مردابی ضروری به نظر می رسد.

کشت بافت و سلول به میزان زیادی برای تولید زنبق استفاده شده و به مقدار قابل توجهی باعث افزایش تولید و بهبود بخشیدن کیفیت گیاهان تولید شده از طریق کشت بافت شده است (۲۹). تکثیر درون شیشه‌ای تک لپه‌ای‌ها به علت ظرفیت باززایی پایین آنها در

۱و۲- دانشیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه محقق اردبیلی
(*-نویسنده مسئول: Email: echamani@uma.ac.ir)

مقایسه با دو لپه‌ای‌ها پیچیده‌تر است. آنالیزهای ظرفیت باززایی در بعضی تک لپه‌ای‌های زینتی نشان داد که باززایی در تیره Iridaceae نسبت به Amaryllidaceae، Araceae و Liliaceae کمتر است. به همین علت انتخاب اندام یا بافت مناسب به عنوان ریزنمونه در گسترش تولید گیاه از طریق کشت بافت ضروری می‌باشد (۲۲).

هورمون‌های گیاهی اثر زیادی روی کشت بافت دارند و پس از اینکه وارد چرخه تقسیم سلول شدند، سبب تمایز بافت و اندام‌زایی می‌شوند (۵). مهم‌ترین تنظیم کننده‌های رشد در کشت‌های درون شیشه‌ای، اکسین‌ها و سایتوکنین‌ها هستند به طوری که نسبت اکسین‌ها و سایتوکنین‌ها در محیط کشت، می‌توانند روند ریشه‌زایی و شاخه‌زایی را تحت تاثیر قرار دهند (۱).

اکسین‌ها نقش اصلی را در کنترل هورمونی برای ریخت‌زایی بازی می‌کنند و اثراتشان در تمایز سلول‌ها به علت ارتباط نزدیکی است که با هورمون‌های درون‌زا و سایر فاکتورهای رشدی اضافه شده به محیط کشت دارند (۶). کالوس‌زایی در بسیاری از گونه‌های گیاهی با افزودن اکسین‌های خارجی مثل 2,4-D، IBA و NAA به محیط کشت القا می‌شود. همه انواع و سطوح اکسین‌ها در پاسخ‌های گیاه به کشت درون شیشه‌ای اثر دارند، اگرچه ژنوتیپ و مرحله رشدی ریزنمونه‌ها نیز فاکتورهای مهمی برای حصول موفقیت هستند (۵).

سایتوکینین‌ها، گروهی از ترکیبات هورمونی می‌باشند که تقسیم سلولی، تغییر در غالبیت انتهایی و تمایزیابی شاخه‌ها را در گیاهان کنترل می کنند. در محیط‌های کشت بافت گیاهی نیز، سایتوکینین‌ها عمدتاً در تقسیمات سلولی و تمایزیابی شاخه‌های نابجا از کالوس و بافت‌های گیاهی شرکت می‌کنند. این ترکیبات هم‌چنین با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخساره‌ها می شوند. استفاده از این ترکیبات در محیط‌های کشت بافت گیاهی به تنهایی یا همراه با سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، بویژه اکسین‌ها، متداول می‌باشد (۲۵)

استفاده از تکثیر درون شیشه‌ای جایگزین مناسبی برای غلبه بر مشکلات تکثیر در این گیاه می‌باشد. پژوهش حاضر نیز در همین راستا و به منظور یافتن ترکیب مناسب جهت غلبه بر مشکلات خفتگی بذر و مطالعه تأثیر برخی ترکیبات بر باززایی درون شیشه‌ای آن پایه ریزی شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور مطالعه بهبود جوانه‌زنی بذر زنبق مردابی دو آزمایش جداگانه در دو زمان متفاوت برای بررسی تاثیر روش‌های مکانیکی و شیمیایی روی القای جوانه‌زنی بذر زنبق مردابی انجام شد.

بذرهای زنبق مردابی در شهریور ۱۳۹۰ از محل طبیعی آن در مراتع باتلاقی اطراف ساری تهیه شده و به عنوان ریز نمونه مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور جداسازی بذرها، کپسول‌ها به مدت دو هفته در معرض هوای آزاد قرار گرفتند تا خشک شده و باز شوند. این بذور تا زمان انجام آزمایش در دمای اتاق نگهداری شدند. در آزمایش اول، اثر غلظت NaOH بر جوانه‌زنی بذر بررسی شد. چهار غلظت NaOH (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ مولار) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار استفاده گردید. برای هر غلظت از ۵۰ عدد بذر استفاده شد. بذرها به مدت ۲۰ ساعت در محلول NaOH قرار گرفته و هر یک ساعت تکان داده شدند. پس از طی این مدت، بذرها به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شسته شدند تا پوسته خارجی بذر که سست شده جدا شود. سپس با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده و ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرها تحت شرایط استریل در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت نیم مقدار MS با ۷ گرم آگار و فاقد هورمون‌های تنظیم کننده رشد (pH=۸/۵) کشت شدند و به ژرمیناتور با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انتقال داده شدند.

در آزمایش دوم اثر خراش‌دهی مکانیکی روی جوانه‌زنی بذر بررسی شد. در این آزمایش، از سه حالت خراش‌دهی با سمباده (خراش‌دهی نرم، خراش‌دهی متوسط و خراش‌دهی سخت) و شاهد (C) با ۵ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. برای هر تیمار از ۵۰ عدد بذر استفاده شد و نوک بذرها در ناحیه میکروپیلار سمباده زده شد. در خراش‌دهی نرم، نوک بذر؛ در خراش‌دهی متوسط ابتدای میکروپیلار و در خراش‌دهی سخت تا مشاهده نوک جنین بذرها سمباده زده شدند. سپس بذرها مانند آزمایش قبل استریل شده و کشت شدند.

پس از ۱ ماه داده برداری از هردو آزمایش انجام شد و درصد جوانه‌زنی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد جوانه‌زنی} = \frac{\text{تعداد بذور جوانه زده}}{\text{تعداد کل بذور}} \times 100$$

۲ ماه بعد از جوانه‌زنی بذور، برگ‌ها و ریشه‌ها از دانهال‌ها حذف شدند و هیپوکوتیل در محیط کشت MS با ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر ساکارز، ۷ میلی‌گرم بر لیتر آگار، بدون هورمون به عنوان شاهد و طی دو آزمایش جداگانه انجام گرفت که در آزمایش اول غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های اکسین (پیکلرام و 2,4-D) و در آزمایش دوم غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر سایتوکینین (TDZ و BA) با ۴ تکرار برای هر تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی کشت شدند. ریزنمونه ها در داخل لوله آزمایش کشت شدند و در هر لوله آزمایش نیز یک گیاه کشت گردید. سپس نمونه‌ها به ژرمیناتور با دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و پس از دو ماه داده برداری انجام شد.

درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و وزن کالوس به عنوان پارامترهای رشد کالوس، دو ماه پس از قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی اکسین‌ها اندازه‌گیری شدند.

تعداد برگ، طول برگ و وزن تر برگ نیز به عنوان پارامترهای رشد گیاهچه‌ها، دو ماه پس از قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی سایتوکینین اندازه‌گیری شد.

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین داده‌ها نیز به روش آزمون Duncan انجام شد.

نتیجه و بحث

اثر خراش‌دهی شیمیایی و مکانیکی بر جوانه‌زنی بذر زنبق مردابی

بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول تجزیه واریانس (جداول ۱ و ۲) تیمارهای خراش‌دهی مکانیکی و شیمیایی برای صفت درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند. نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی در روش خراش‌دهی مکانیکی (شکل ۱) نشان داد که بیشترین تأثیر مربوط به خراش‌دهی سخت می‌باشد که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. به‌طوری‌که در تیمار خراش‌دهی سخت درصد جوانه‌زنی حدود ۷۶ درصد بود، درحالیکه هیچ‌گونه جوانه‌زنی در شاهد مشاهده نگردید. این نتایج با مطالعات زارع و همکاران (۴۴)، روی گونه‌های *Prosopis koelzizna* و *P. juliflora* مطابقت داشت. آن‌ها گزارش کردند که خراش‌دهی بذرها با کاغذ سمباده باعث افزایش جوانه‌زنی در حدود ۸۰ درصد شد.

نتایج مقایسه میانگین مربوط به تیمار خراش‌دهی شیمیایی (شکل ۲) نشان داد که بیشترین میانگین درصد جوانه‌زنی مربوط به بذور تیمار شده با غلظت ۲۰ مولار NaOH بود که با بذور تیمار شده با غلظت ۱۵ مولار اختلاف معنی‌داری نداشت. درحالی‌که با شاهد و سایر غلظت‌ها، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت. تیمار ۲۰ مولار NaOH باعث از بین رفتن پوسته بذر و افزایش درصد جوانه‌زنی از صفر به ۶۲ درصد شد. درصد جوانه‌زنی در تیمارهای با غلظت ۵ و ۱۰ مولار به میزان زیادی پایین بود بطوریکه تیمار ۵ مولار باعث ژله‌ای شدن اندوسپرم و از بین رفتن آن شد. در آزمایش مشابهی سون و همکاران (۴۰) اثر خراش‌دهی با غلظت ۱۴/۸۳ مولار NaOH در زمان‌های مختلف و تیمار سرمادهی را بر جوانه‌زنی بذر گونه *Iris lactea* بررسی کرده و نشان دادند که تیمار با NaOH به مدت ۲۰ ساعت بیشترین درصد جوانه‌زنی (۵۶ درصد) را نشان داد. همچنین بذرهای تیمار شده با NaOH که به مدت ۴۰ روز سرمادهی شده بودند بیشترین میزان جوانه‌زنی (۸۰ درصد) را در مقایسه با شاهد نشان دادند.

جوانه زنی بذر بستگی به پتانسیل رشد جنین دارد. ساختارهای احاطه کننده جنین (اندوسپرم و پریکارپ) و همچنین عوامل محیطی و هورمون‌ها روی رشد جنین اثر دارند (۳۰). پوسته بذر بازدارنده قوی در جوانه‌زنی بذر است که با محدود کردن جذب آب و اکسیژن و همچنین تولید و نگهداری بازدارنده‌های شیمیایی، به میزان زیادی از جنین در مقابل شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌کند (۲۴). طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، تیمار خراش‌دهی سخت با کاغذ سمباده سبب شکسته شدن خواب پوسته بذر و بیشترین درصد جوانه‌زنی (۷۶ درصد) در بذور زنبق مردابی شد. خراش دهی با کاغذ سمباده سبب برداشته شدن نوک میکروپیلار شده، به این ترتیب عامل بازدارنده جوانه‌زنی حذف شد و جنین در تماس مستقیم با محیط کشت قرار گرفته و درصد جوانه‌زنی افزایش پیدا کرد.

برای از بین بردن پوسته سخت بذر از خراش‌دهی شیمیایی (حذف پوسته سخت بذر با غلظت‌های مختلف NaOH) استفاده شد. بذرهای زنبق مردابی تیمار شده با NaOH (۲۰ مولار) بیشترین درصد جوانه‌زنی (۶۲ درصد) را در مقایسه با سایر غلظت‌ها نشان دادند. استفاده از محلول NaOH برای شکستن خواب بذر در مطالعات قبلی روی گونه‌های *Iris lacteal* (۴۰) و *Zoysia japonica* (۱۴) گزارش شده است.

وو و همکاران (۴۳) دریافتند که پوسته خارجی بذرهای گونه‌های *I. lortiti* و *I. confuse* محتوی ترکیبات سمی برای جوانه‌زنی هستند. باسکین و همکاران (۲) دریافتند که علت اصلی خواب بذور زنبق، پتانسیل رشد کم جنین‌ها و عدم توانایی آن‌ها برای غلبه بر مقاومت مکانیکی پوسته سخت بذر است. عدم نفوذپذیری پوسته بذر به آب و تبادلات گازی نشان دهنده بازدارنده‌های فیزیکی و بیوشیمیایی در پوسته بذر است (۳). تیمار با NaOH سبب نرم شدن و از بین رفتن پوسته سخت بذر، و افزایش نفوذپذیری آب و تبادلات گازی شده، و جوانه‌زنی بذر را به دنبال دارد.

طبق بررسی‌های انجام شده، مشخص گردید گونه‌ای که در این تحقیق استفاده گردید نیاز به سرمادهی نداشته و می‌توان با استفاده از تیمارهای شیمیایی یا مکانیکی، جوانه‌زنی بذر را در این گونه به میزان زیادی افزایش داد.

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی زنبق مردابی در خراش‌دهی مکانیکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۰/۲*
خطا	۱۶	۰/۰۰۲
%CV	۵/۶۹ (پنج و شصت و نه صدم)	

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

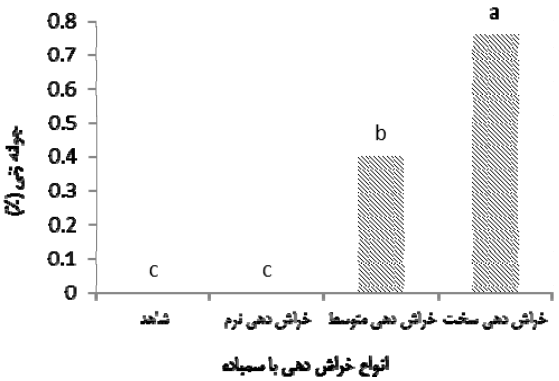
با توجه به اینکه تیمار مکانیکی نیاز به استفاده از مواد شیمیایی مثل NaOH یا H_2SO_4 ندارد و با توجه به این‌که استفاده از مواد شیمیایی هزینه بر می‌باشد، روش‌های مکانیکی برای القای جوانه‌زنی

طبق یافته‌های این تحقیق روش مناسبی به نظر می‌رسد.

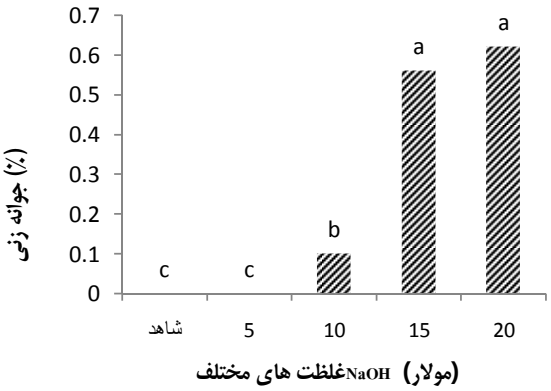
جدول ۲- تجزیه واریانس درصد جوانه‌زنی زنبق مردابی در خراش‌دهی شیمیایی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۴	۰/۱۵*
خطا	۲۰	۰/۰۰۲
%CV	۵/۳ (پنج و سه دهم)	

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۱- اثر خراش‌دهی مکانیکی بر جوانه‌زنی بذر زنبق مردابی



شکل ۲- اثر خراش‌دهی شیمیایی بر جوانه‌زنی بذر زنبق مردابی

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کشت درون شیشه‌ای دانهال‌های بذری زنبق مردابی

علائم اختصاری D_1, D_2, D_4 به ترتیب غلظت‌های ۱،۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D ، T1, T2, T4 به ترتیب غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون، P1, P2, P4 به ترتیب غلظت‌های ۱،۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر پیکلرام، B1, B2, B4 به ترتیب غلظت‌های ۱،۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و Ctrl، شاهد می‌باشد.

اثر غلظت‌های مختلف پیکلرام و بر پارامترهای رشد کالوس

قطعات کشت شده هیپوکوتیل زنبق مردابی در هر دو تیمار هورمونی بکار رفته تمایل به تشکیل کالوس از خود نشان دادند. در این آزمایش از محیط پایه MS حاوی غلظت‌های متفاوتی از 2,4-D و پیکلرام استفاده شد. پس از گذشت دو ماه، تشکیل کالوس روی قطعات کشت شده در تمامی محیط‌های کشت بکار رفته بجز محیط‌های فاقد هورمون قابل مشاهده بود. بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول۳) اثر تیمارهای هورمونی بکار رفته برتمامی صفات اندازه‌گیری شده (درصد کالوس‌زایی، قطر و وزن کالوس) در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌های انجام شده نشان داد، از میان سطوح هورمونی به‌کار برده شده، غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر پیکلرام بهترین نتیجه را در ارتباط با صفات اندازه‌گیری شده ایجاد کرد. این در حالی بود که در 2,4-D کمترین غلظت (۱ میلی‌گرم بر لیتر)، نتیجه مطلوب‌تری را در این صفات نشان داد و با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر پیکلرام اختلاف معنی‌داری نداشت. در ارتباط با صفت درصد کالوس‌زایی، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۸۴ درصد) در غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر پیکلرام حاصل شد و با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین بین غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر پیکلرام، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در درصد کالوس‌زایی مشاهده نگردید (شکل ۳). پس از تیمار ریزنمونه‌ها، حدود یک ماه پس از کشت، ریزنمونه‌ها نسبت به تیمارهای پیکلرام واکنش نشان دادند. شروع واکنش با متورم شدن ریزنمونه همراه بود و نهایتاً دو ماه بعد از کشت کالوس تشکیل شد. کلیه غلظت‌های به کار رفته پیکلرام باعث القای کالوس در ریزنمونه‌های مورد آزمایش شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در صفت وزن کالوس بین غلظت‌های استفاده شده پیکلرام تفاوت معنی‌داری وجود داشت. مقایسه میانگین‌های انجام شده نشان داد که بیشترین وزن کالوس در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر پیکلرام حاصل شد و با کاهش غلظت، وزن تر کالوس نیز کاهش یافت (شکل ۴). نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش کالوس‌زایی، با افزایش غلظت پیکلرام بود که با نتایج آزمایشات زیر مطابقت دارد. سنر و همکاران (۳۶) اثر غلظت‌های متفاوت پیکلرام را در ارقام جو بررسی کرده و اظهار داشتند که با افزایش غلظت این هورمون از ۲/۵ به ۷ میلی‌گرم بر لیتر درصد کالوس‌زایی افزایش یافت. کیم و همکاران (۲۵) با استفاده از غلظت‌های مشابه این آزمایش، ایجاد کالوس‌های جنین‌زا را در سوسن

شرقی[1] گزارش کردند. کدرا و بچ (۲۳) القای کالوس را در *Lilium martagon* بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که القای کالوس از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل کشت شده در محیط کشت حاوی ۵–۰/۵ میکرومولار پیکلرام ۱۰۰–۸۰ درصد بود. اثر مثبت پیکلرام بر القای کالوس قبلاً در تک لپه‌ای‌ها گزارش شده بود. غلظت‌های پایین پیکلرام سبب ایجاد کالوس‌های سفید و دانه دانه در دانهال‌های کشت شده *Lilium longiflorum* گردید (۴۱).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که بین سه غلظت استفاده شده 2,4-D، غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین وزن تر را در مقایسه با سایر غلظت‌ها داشت و با افزایش غلظت 2,4-D از وزن تر کالوس‌ها کاسته شد (شکل ۴). غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۳ درصد) را داشت اما بین سایر غلظت‌ها (۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر) از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳). با توجه به نتایج به‌دست آمده از این آزمایش، غلظت‌های پایین‌تر 2,4-D بیشترین درصد کالوس‌زایی را به همراه دارند و با افزایش غلظت 2,4-D کالوس‌زایی کاهش پیدا می‌کند که این یافته با نتایج جورموویک و رادوجویک (۲۱) مطابقت داشت. آن‌ها بیشترین سرعت القای کالوس را در *Iris pumila* در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آوردند. بولتنکوف و همکاران (۷) بیشترین درصد القای کالوس را در *Iris ensata* در محیط کشت حاوی ۲–۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D گزارش کردند. کیم و همکاران (۲۶) القای کالوس را از ریزنمونه‌های مختلف در *Iris pseudacorus* بررسی کردند. این محققین گزارش کردند که بیشترین کالوس‌های القا شده از ریزنمونه‌های ریشه در حضور ۴/۵۲ مایکرومولار 2,4-D حاصل شد و 2,4-D برای القای کالوس در این گیاه مؤثر بود. طبق یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر بیشترین قطر کالوس در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست آمد که با نتایج فوق مطابقت داشت. به طور کلی اکسین‌ها، معمولاً 2,4-D در دامنه غلظت ۳–۱ میلی‌گرم بر لیتر برای القای کالوس ضروری هستند (۱۵). نتایج حاصل از این بررسی نیز نشان‌دهنده ضرورت وجود 2,4-D در محیط کشت برای القای کالوس است. رادوجوویک و سوبوتیک (۳۳) گزارش کردند که وجود 2,4-D برای القای کالوس و جنین‌زایی در *Iris pumila* ضروری است. شیبلی و آجلونی (۳۷) گزارش کردند که غلظت‌های بالای 2,4-D در تشکیل کالوس در کشت سوسپانسیون سلولی زنبق سیاه اثر بازدارنده دارد. کومار و روپاواتی (۲۷) گزارش کردند که، معمولاً 2,4-D به عنوان قوی‌ترین اکسین مطرح است و مشخص شده است که استفاده از مقادیر بالای اکسین طویل شدن سلول و افزایش تقسیم سلولی را سبب می‌شود، اما در این تحقیق ملاحظه گردید که افزایش غلظت این هورمون نه‌تنها افزایش تولید کالوس را به دنبال نداشت، بلکه خود عاملی جهت تخریب ریزنمونه نیز بود که این امر با یافته‌های این محققین مطابقت نداشت. شدت تکثیر کالوس به حدی بود که پس از مدتی بافت کالوس تمام ریزنمونه را در بر گرفت. تحریک تولید و تکثیر کالوس اگرچه در قسمت انتهای پایینی هیپوکوتیل بیشتر بود اما در تمام بخش‌های ریزنمونه با هم شروع شد.

استفاده از گیاهان کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای برای القای کالوس بسیار سودمند است. آن‌ها مشکلات ضدعفونی کردن گیاه مادری را ندارند (۲۱). با این‌که کشت بافت در تک لپه‌ای‌ها به مراتب سخت‌تر از دو لپه‌ای‌ها می‌باشد، اما باززایی به نوع اندام، میزان هورمون، سن اندام یا بافت بسیار وابسته است. برای مثال، گل‌های نابالغ بهترین نوع ریزنمونه جهت باززایی در گیاه *Iris ensata* بوده است (۱۸). در انگیزش کالوس نیز قسمت‌های نابالغ مثل قاعده برگ‌های جوان مناسب‌تر می‌باشد. از میان تنظیم‌کننده‌های رشد، نقش 2,4-D به عنوان یک اکسین پایدار در انگیزش و رشد کالوس در زنبق شناخته شده است (۷).

هورمون‌های گیاهی اثر مهمی بر کشت بافت دارند. بعد از اینکه آن‌ها وارد چرخه تقسیم سلول شدند، سبب تمایز بافت و اندام می‌شوند.کالوس‌زایی در بسیاری از گونه‌های گیاهی با افزودن اکسین‌های خارجی مانند، 2,4-D، IBA و NAA به محیط کشت القا می‌شود. نوع و سطوح اکسین مورد استفاده روی پاسخ درون شیشه‌ای اثر می‌گذارد، اگرچه ژنوتیپ و مرحله رشدی ریزنمونه هم فاکتورهای مهمی جهت حصول نتیجه رضایت بخش هستند (۱۰). در بین هورمون‌های مختلفی که برای القاء و رشد کالوس استفاده می‌شود، اکسین را جزء مؤثرترین هورمون‌ها دانسته واثبات کرده‌اند در بین اکسین‌های مختلف، 2,4-D بهترین نتیجه را برای القاء و تکثیر کالوس دارد (۱۹). با افزایش غلظت 2,4-D در محیط کشت، افزایش تقسیمات سلولی در سطوح زخمی و در نتیجه افزایش وزن تر کالوس‌ها مورد انتظار خواهد بود. تاثیر مثبت 2,4-D در القا و رشد کالوس دارای یک حد آستانه است و پس از این حد، افزایش غلظت این هورمون در محیط کشت اثر بازدارندگی در تقسیم سلولی خواهد داشت، در نتیجه موجب کاهش وزن تر کالوس خواهد شد. چنان که از نتایج این بررسی برمی‌آید، غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D اثر تقویت کننده و بیش از آن (۴ میلی‌گرم بر لیتر) اثر بازدارنده در افزایش وزن کالوس داشت. همچنین حداکثر کالوس‌زایی در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر هورمون 2,4-D مشاهده شد و با افزایش غلظت به ۴ میلی‌گرم بر لیتر کالوس‌زایی کاهش یافت.

در این آزمایش اثر واضح اکسین‌ها در محیط کشت بر القا و پرآوری کالوس مشاهده شد. پیکلرام در کشت بافت برای القا یا

1- Easter lili

نگهداری کالوس‌ها استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر اضافه کردن پیکلرام (۴ میلی‌گرم بر لیتر) به محیط کشت، بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشت.

نتایج متفاوتی گزارش شده که پیکلرام سریع‌تر از 2,4-D سبب کالوس‌زایی، القای جنین و نگهداری جنین‌های ایجاد شده در *Gasteria* و *Howarthia* شد (۳). از طرف دیگر کالوس‌زایی توسط پیکلرام در نیشکر نسبت به 2,4-D کندتر بود (۱۳) و 2,4-D در مقایسه با سایر اکسین‌ها در کشت نارگیل مؤثرتر بود (۴). این نتایج احتمالاً به علت تفاوت بین گیاهان یا ریزنمونه‌های مورد استفاده است.

در تحقیق حاضر اثر هورمون‌های 2,4-D و پیکلرام بر القای کالوس در ریزنمونه‌های حاصل از دانهال‌های بذری زنبق مردابی بررسی شد و نتایج نشان دهنده ضرورت وجود اکسین‌ها برای القای کالوس است. اگرچه درصد القای کالوس در 2,4-D و پیکلرام متفاوت بود اما تفاوت معنی‌داری بین این دو اکسین وجود نداشت. غلظت‌های بالای 2,4-D کاهش درصد تشکیل کالوس را نشان دادند که با نتایج چن و همکاران (۸) مطابقت دارد. در مقابل، غلظت‌های بالای پیکلرام برای القای کالوس از دانهال‌های زنبق مناسب بود که با نتایج هو و واسیل (۱۵) مطابقت دارد. مشابه نتایج بدست آمده از مطالعات چنگالرایان و همکاران (۹)، تفاوت مورفولوژیکی بین کالوس‌های القا شده توسط 2,4-D و پیکلرام مشاهده نشد. در هر حال مقدار تولید کالوس به میزان زیادی به غلظت 2,4-D و پیکلرام بستگی دارد.

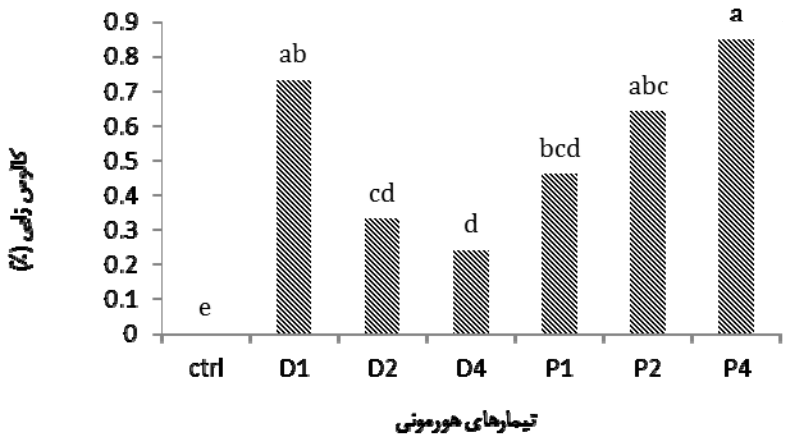
اثر غلظت‌های مختلف TDZ و BA بر پارامترهای رشد گیاهچه

به‌منظور بررسی اثر هورمون‌های سایتوکینین بر ویژگی‌های رشدی گیاهچه، هیپوکوتیل گیاهچه‌های حاصل از رشد بذر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوتی از TDZ و BA قرار گرفتند. قطعات کشت شده هیپوکوتیل زنبق مردابی در هر دو تیمار هورمونی بکار رفته برگ تولید کردند بدون اینکه ریشه‌ای تولید شود. پس از گذشت ۲ ماه، برگ‌های جدید روی قطعات کشت شده در تمامی محیط‌های کشت بکار رفته قابل مشاهده بود. بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۵) اثر تیمارهای هورمونی بکار رفته برتمامی صفات اندازه‌گیری شده (تعداد برگ، طول برگ و وزن تر برگ) در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌های انجام شده نشان داد، از میان سطوح هورمونی به‌کار برده شده، غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA بهترین نتیجه را در ارتباط با همه صفات اندازه‌گیری شده ایجاد کرد.

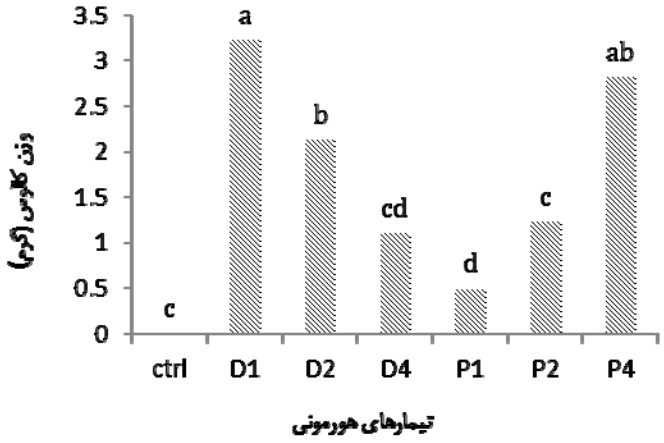
جدول۳- تجزیه واریانس اثر 2,4-D و پیکلرام بر صفات درصد کالوس‌زایی، وزن و قطر کالوس در زنبق مردابی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		قطر کالوس	وزن کالوس	درصد کالوس‌زایی
تیمار	۶	۰/۱۳**	۰/۷۸**	۰/۱**
خطا	۲۱	۰/۰۰۷	۰/۰۳	۰/۰۱
%CV		۸/۵۴ (هشت و پنجاه و چهار صدم)	۱۴/۱۶ (چهارده و شانزده صدم)	۱۰/۳۴ (ده و سی و چهار صدم)

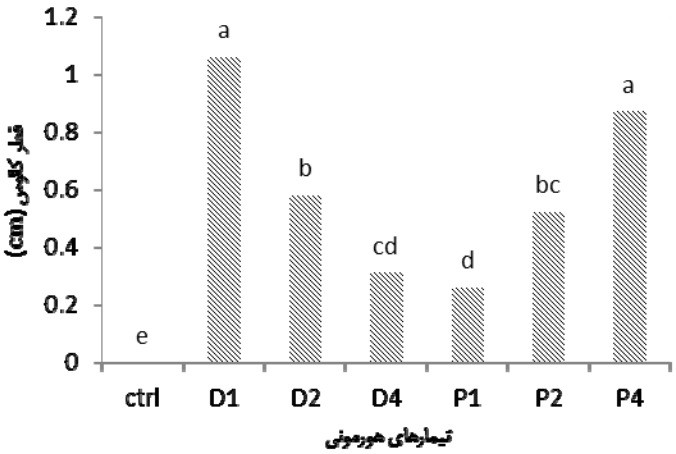
** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳- اثر پیکلرام و 2,4-D بر درصد کالوس‌زایی از هیپوکوتیل حاصل از بذر زنبق مردابی



شکل ٤- اثر پیکلرام و 2,4-D بر وزن کالوس حاصل از هیپوکوتیل زنبق مردابی



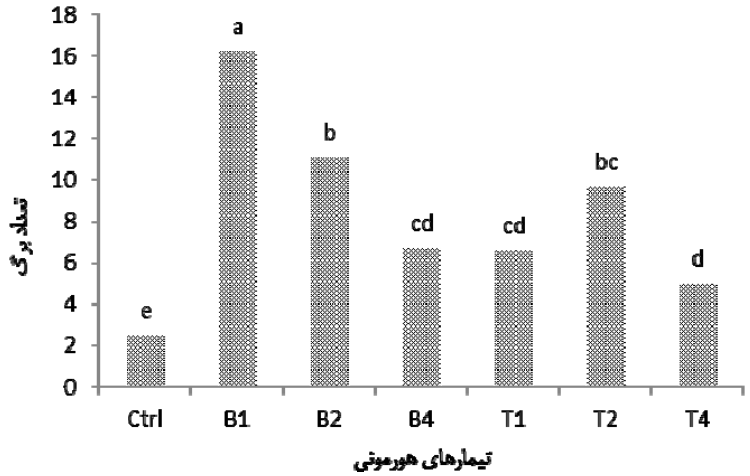
شکل ٥- اثر پیکلرام و 2,4-D بر قطر کالوس حاصل از هیپوکوتیل زنبق مردابی

این در حالی بود که غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ در صفت تعداد برگ بهترین نتیجه را نشان داد اما با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA اختلاف معنی‌داری نداشت. در صفات طول برگ و وزن تر برگ، غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر TDZ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت اما در صفت وزن تر برگ با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA اختلاف معنی‌داری داشت. نتایج حاصل از پژوهش دامیرالی و همکاران (۱۲) برکشت درون شیشه‌ای انجیر خوراکی حاکی از آن بود که استفاده از ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA بهترین غلظت در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجیر بود که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. نتایج مشابهی در کشت درون شیشه‌ای انار توسط نایک و همکاران با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA مشاهده شد. نتایج بدست آمده از پژوهش ریکاپلونس و کورک (۳۵) بر ریزازدیادی فیکوس بنجامین نشان داد که استفاده از ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA بهترین غلظت در شرایط رشد درون شیشه‌ای این گیاه بود که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی ندارد. اختلاف ژنتیکی بین گونه‌های زنبق و فیکوس بنجامین می‌تواند از دلایل عدم این همخوانی باشد. معمولا با افزایش غلظت سایتوکینین‌ها در محیط کشت، تعداد شاخساره افزایش می‌یابد اما در این آزمایش با افزایش غلظت BA پرآوری کاهش یافت که با نتایج مجیب و پال (۳۲) مطابقت دارد. این محققین اظهار داشتند که در بین غلظت‌های مختلف هورمون BA کمترین غلظت این هورمون (۱ میلی‌گرم بر لیتر) سبب تولید بیشترین تعداد شاخساره شد. شمارش تعداد برگ گیاهچه نشان داد که تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA با میانگین ۱۶ برگ بیشترین تعداد برگ را دارا بود که با سایر تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین آن در شاهد با میانگین ۲ برگ مشاهده شد و با افزایش غلظت از تعداد برگ‌ها کاسته شد.

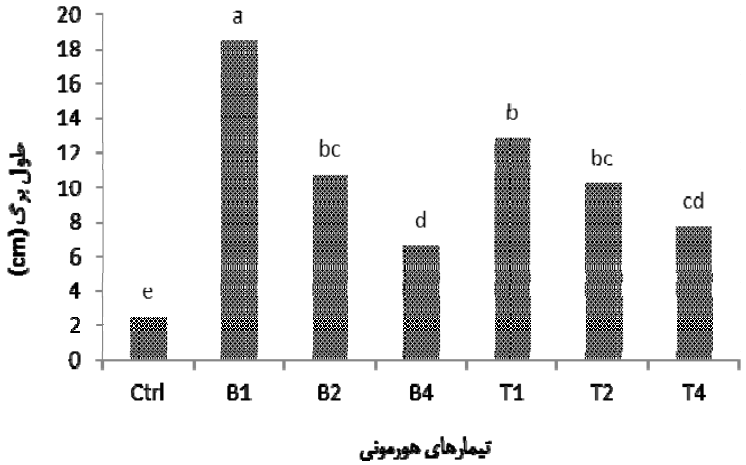
جدول۵- تجزیه واریانس اثر TDZ و BA بر صفات طول، وزن و تعداد برگ در زنبق مردابی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		طول برگ	وزن برگ	تعداد برگ
تیمار	۶	۲/۷۳**	۰/۱۵**	۲/۳۷**
خطا	۲۱	۰/۱۲	۰/۰۱	۰/۱۳
%CV		۱۱/۲۱ (یازده و بیست و یک صدم)	۹/۵۹ (نه و پنجاه نه صدم)	۶/۱۲ (شش و دوازده صدم)

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد



شکل ٦- اثر TDZ و BA بر تعداد برگ حاصل از هیپوکوتیل زنبق مردابی



شکل ۷- اثر TDZ و BA بر طول برگ حاصل از هیپوکوتیل زنبق مردابی

بیشترین طول برگ در تیمار BA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که با همه تیمارهای استفاده شده اختلاف معنی‌داری داشت (شکل های ۸-۳). برخی از محققین غلظت‌های بالاتری از سایتوکینین‌ها را برای افزایش تعداد شاخساره پیشنهاد کردند، اما تحقیق حاضر نشان داد که غلظت‌های بالای TDZ یا BA (۴ میلی‌گرم بر لیتر) نه‌تنها موجب افزایش پرآوری نگردید بلکه کاهش رشد گیاهچه را به‌دنبال داشت. مالیک و ساکسنا (۲۹) گزارش کردند که غلظت‌های بالای TDZ باززایی شاخه را کاهش می‌دهد و سبب ایجاد شاخه‌های رشد نکرده می‌شود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. دفالا و همکاران (۱۱) اثر غلظت‌های متفاوت TDZ، 2,4-D و

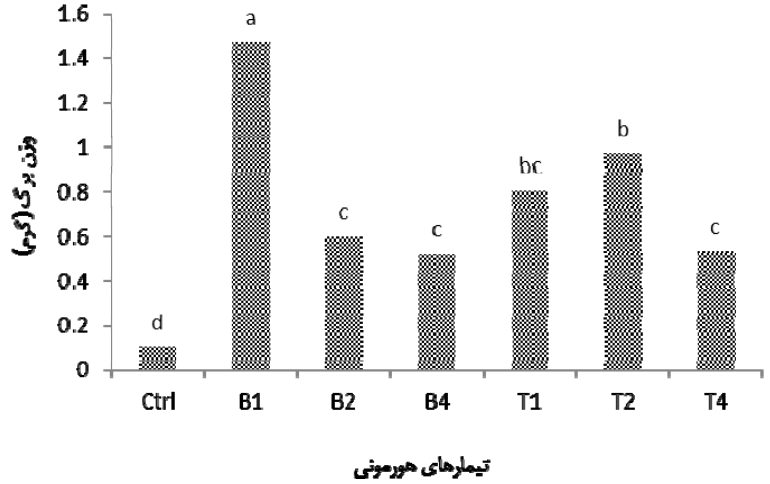
BA را بر باززایی در گیاه *Boscia senegalensis* بررسی کردند. آنها گزارش کردند که BA از طریق اندام‌زایی مستقیم و تشکیل شاخه‌های انتهایی سبب تولید شاخساره‌های نابجا شد. TDZ و 2,4-D هر دو تمایل به تشکیل کالوس داشتند. این تفاوت‌ها ناشی از غلظت هورمون مورد استفاده، مدت زمان قرار گرفتن ریزنمونه در محیط کشت حاوی هورمون، نوع ریزنمونه کشت شده و گونه می‌باشد.

ژنگ و همکاران (۴۵) گزارش کردند که سایتوکینین‌ها باززایی در تک لپه‌ای‌ها را کنترل می‌کنند. بولتنکوف و همکاران (۵) گزارش کردند که BA توسعه اندام‌های گل‌دار را در چندین گونه از زنبق بهبود بخشید. نتایج حاصل از آزمایش آنها نشان‌دهنده نقش کلیدی این هورمون در توسعه مستقیم ساختارهای نابه‌جا از بافت‌های گل‌دار در گونه‌های مورد مطالعه است. فوجینو و همکاران (۱۱) تکثیر زنبق هلندی[1] را توسط کشت اندام‌های مختلف بررسی کردند. آنها گزارش کردند که تشکیل جوانه و شاخساره و وزن تر گیاهچه‌ها در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۸ میلی‌گرم بر لیتر آدنین افزایش یافت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. به‌نظر می‌رسد BA در حفظ مقادیر کافی از هورمون‌های ضروری برای اندام‌زایی مناسب در بافت ریزنمونه، نقش دارد (۱۱). شیبلی و آجلونی (۳۷) گزارش کردند که BA مناسب‌ترین سایتوکینین برای القای شاخه در زنبق‌هاست که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد. با توجه به شکل‌های ۶ و ۷ بیشترین شاخه‌زایی در تیمار با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA حاصل شد.

سایتوکینین‌ها، گروهی از هورمون‌های گیاهی با اثر محرک رشد به‌شمار می‌روند که در تنظیم فرآیندهای مختلف رشد و نمو حائز اهمیت هستند (۱۷). حضور سایتوکینین‌ها در محیط کشت برای باززایی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای ضروری است، زیرا این هورمون‌ها برای بیان ژن‌های مناسب برای تمایزیابی جوانه‌های ساقه ضروری هستند (۱۵). توانایی سایتوکینین‌های مختلف در القای شاخساره را می‌توان به فاکتورهایی از قبیل پایداری، تحرک و سرعت ترکیب و اکسیداسیون هورمون نسبت داد، بنابراین به نظر می‌رسد شرایط هورمونی فاکتور تعیین کننده برای افزایش موفقیت آمیز تشکیل جوانه‌های نابجا و پرآوری شاخساره باشد (۱۱).

شایان ذکر است که تعیین مناسب‌ترین نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت یکی از مهمترین نشانه‌های موفقیت در ریزازدیادی در میان سایر فاکتورها است (۳۸). یافتن غلظت‌های مناسب هورمونی جهت مراحل باززایی و پرآوری مستلزم درنظر گرفتن مزایا و معایب استفاده از غلظت‌های هورمونی بالاست، زیرا اگرچه در مواردی غلظت‌های بالای هورمونی کمک به تسریع باززایی یا افزایش شاخه‌زایی می‌کنند اما گاهی موجب بدشکل شدن گیاهان تولید شده می‌شوند.

بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان اظهار داشت که کاربرد هورمون BA برای افزایش تعداد برگ و طول برگ مناسب می‌باشد و تاثیر مطلوب‌تری نسبت به TDZ در باززایی زنبق دارد.



شکل ۸- اثر TDZ و BA بر وزن تر برگ حاصل از هیپوکوتیل زنبق مردابی

منابع

۱- پیری خ. و نظریان فیروزآبادی ف. ۱۳۸۸. راهنمای کشت بافت گیاهان. انتشارات بوعلی سینا.

1- *Iris hollandica*

2- Baskin J.M., and Baskin C.C. 2003. New approaches to the study of the evolution of physical and physiological dormancy, the two most common classes of seed dormancy on the earth. The Biology of Seeds,4: 371-380.
3-Beyl C.A., Sharma G.C. 1983. Picloram induced somatic embryogenesis in Gasteria and Haworthia. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2: 123-132.
4- Blake J., Eeuwens C.J. 1982. Culture of coconut palm tissues with a view to vegetative Propagation. Springer, 9: 145-148.
5- Boltenkov E.V., Rybin V.G. and Zarembo E.V. 2003. Specific Features of cultivation of *Iris ensata* Thunb. Callus Tissue. Applide biochemistry and microbiology, 40(2): 206-212.
6- Boltenkov E., Zarembo E. 2005. *In vitro* regeneration and callogenesis in tissue culture of floral organs of the genus Iris (Iridaceae). Biology Bulletin, 32 (2): 138-142.
7- Boltenkov E. V., Mironova L. N. and Zarembo E. V. 2006. Effect of Phytohormones on Plant Regeneration in callus culture of *Iris ensata* Thunb. Plant Physiology, 34: 446-450.
8- Chen W.H., Davey M.R., Power J.B. and Cocking E.C. 1988. Control and maintenance of plant-regeneration in sugarcane callus cultures. Journal of Experimental Botany, 39:251-261.
9- Chengalrayan K., Abuzid A. and Gallo-Meagher M. 2005. *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. *In vitro* Cellular & Developmental Biology, 41:477-482.
10- Ciomas J., Reflini K., Iswandar E. and Forster P. 2011. Effects of Picloram in Inflorescence culture of Oil Palm. Plant Cell Tiss Organ Culture, 10: 71-78.
11- Daffalla H., Abdellatef E., Elhadi A. and Khalafalla M. 2010. Effect of Growth Regulators on *In Vitro* Morphogenic Response of *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Poir. Using Mature Zygotic Embryos Explants. Biotechnology Research International, 1-8.
12- Demiralay A., Yalcin-Mendi Y., Aka-kacar Y. and Cetiner S. 1998. *In vitro* propagation of *Ficus Carica* L. var. Bursa siyahi through meristem culture. Acta Horticulture, 480: 165-167.
13- Fitch M. M., Moore P. H. 1990. Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 20:157–163.
14- Han J.G., Ni X.Q., Mao P.S., Pu X.C., and Du G.P. 1996. Method to break dormancy in *Zoysia japonica* seed. Acta Agrestia Sinca, 4: 246-250.
15- Ho W. J., Vasil I. K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Sacharrum officinarum* L.). I. The morphology and ontogeny of somatic embryos. Protoplasma, 118:169-180.
16- Huang X.Q., Wei Z.M, 2004. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). Plant Cell Report, 22:793-800.
17- Johri M.M., Mitra D. 2001. Action of plant hormones. Current Science, 80(2); 199-205.
18- Ichihashi S., Kato S. 1986. Clonal Propagation of *Iris kaempferi* by means of flower organ culture. Bulltein Aichi University Edu, 35: 135-143.
19- Jarvis B.C., Yasmin S. 1987. Plant growth regulators and adventitious root development in relation to auxin. Biologia Plantarum, 29: 189-198.
20-Jehan H., Courois D., Ehret C., Lerch K. and Petiard V. 1994. Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. Plant Cell Reports, 13: 671-675.
21- Jevremovic S., Radojevic L. 2002. Plant regeneration from suspension cultures of *Iris pumila* L. Acta Horticulture, 572: 59-65.
22- Kamo K. Chen J. and Lawson R. 1990. The establishment of cell suspension cultures of gladiolus that regenerate plants, *in vitro* cell development. Biol. Plant. 26: 425- 430.
23- Kedra M., Bach A. 2004. Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture. Acta Biologica, 47: 65-73.
24- Keshtkar A.R., Keshtkar H.R., Razavi S.M., and Dalfardi S. 2008. Methods to break seed dormancy of *Astragalus cyclophyllon*. African Journal of Biotechnology, 7(21): 3874-3877.
25- Kim S.K., Lee J.S., Haung K.H. and Ahn B.J. 2003. Utilization of embryogenic cell cultures for the mass production of bulblets in oriental and easter lilies. Acta Horticulture, 625: 253-259.
26- Kim T., Ahn C., Bae K. and Choi V. 2009. The embryogenic competency and morphological changes during somatic embryogenesis in *Iris pseudacorus*. Korean Society for Plant Biotechnology and Springer, 3: 251-257.
27- Kumar S., Kashyap M. and Sharma D. R. 2005. *In vitro* regeneration and bulblet growth from lily bulbscale explants as affected by retardants, sucrose and irradiance. Biologia Plantarum. 49(4): 629 - 632.
28- Kumar O., Rupavati T. 2002. *In vitro* inductiom of callusogenesis in chilli peper (*Capsicum annum* L.). International Journal Of Current Reseaech, 3: 42-45.
29- Malik K.A., Saxena P.K. 1992. Thidiazuron induces high frequency of shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris* Medik). Australian Journal of Plant

Physiology, 19: 731-740.
30- Mares D.J. 2005. Quarterly reports on plant growth regulation and activities of the PGRSA. 32nd Annual conference the Plant Growth Regulation Society of America, 33(2): 78-89.
31- Mielke K.A. and Anderson W.C. 1989. *In vitro* bulblet formation in Dutch Iris. Hort science, 24: 1028-1031.
32- Mujib A., Pal A.K. 1995. Inter-varietal variation in response to *in vitro* cloning of carnation. Crop Research, 10: 190-194.
33- Radojevic L., Subotic A. 1992. Plant regeneration of *Iris setosa* Pall. through somatic embryogenesis and organogenesis. J. Plant Physiology, 139: 690-696.
34- Ramey V. 2001. *Iris pseudacorus*. Center for aquaticand Invasive Plants, University of Florida.
35- Rzepka-Plevnes D., Kurek J. 2001. The influence of media composition on the proliferation and morphology of *Ficus benjamina* plantlets. Acta Horticulture, 560: 473-476.
36- Şener O., Can E., Arslan M. and Çeliktaş N. 2008. Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring barley cultivars *(Hoerdeum vulgare* L.). Biotechnology & Biotechnological Equipment, 22: 915-920.
37- Shibli R.A., Ajlouni M.M. 2000. Somatic embryogenesis in the endemic black iris. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 61: 15-21.
38- Shimizu S., Tanaka M. and Mori H. 2009. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. Plant Molecular Biology, 69(4): 429-435.
39- Stoltz L.P. 1968. Iris seed dormancy. Physiol. Plant. 21: 1328-1331.
40- Sun Y., Zhang Y. and Wang K. 2006. NaOH scarification and stratification improve germination of *Iris lacteal* var. chinensis seed. Hort Science, 41(3): 773-774.
41- Tribulato A., Remotti P., Loeffler H. and Vantuyl J. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. Plant Cell Reports, 17: 113-118.
42- Villasen˜or CJ., De Lucas MA., Gómez GR. and Mena SJ. 2007. A comparative study of five horizontal subsurface flow constructed wetlands using different plant species for domestic wastewater treatment. Environ Technol. 28: 1333–1343.
43- Wu B.H., Yan J., Zhou Y.H., and Zuo W.X. 1998. Inhibitory effects of seed coat on seed germination in *Iris confuse* and its hybrid. J. Scichan. Agricultural Science in Finland, 16(3): 337-340.
44- Zare S., Tavili A.and Darini M. 2010. Effects of different treatments on seed germination and breaking seed dormancy of *Prosopis koelziana* and *Prosopis Juliflora*. Journal of Forestry Research, 22(1): 35-38.
45-Zheng S., Henken B., Sofiari E., Keizer P., Jacobsen E., Kik C. and Krens F. 1999. Effect of cytokinins and Lines on Plant Regeneration from Long-Term callus and Suspension cultures of *Allium cepa*, L. Euphytica, 108: 83-90.