نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 3، پاییز 1396، ص. 564-555
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 555-564
ISSN: 2008 - 4730

اثر رقم و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای لیلیوم با استفاده از ریزنمونه‌های TCL

احمد شریفی[1*] - فاطمه کیخا آخر[2] - محبوبه یزدی[3]- عبدالرضا باقری[4]

تاریخ دریافت: 1395/03/30
تاریخ پذیرش: 1396/04/09

چکیده

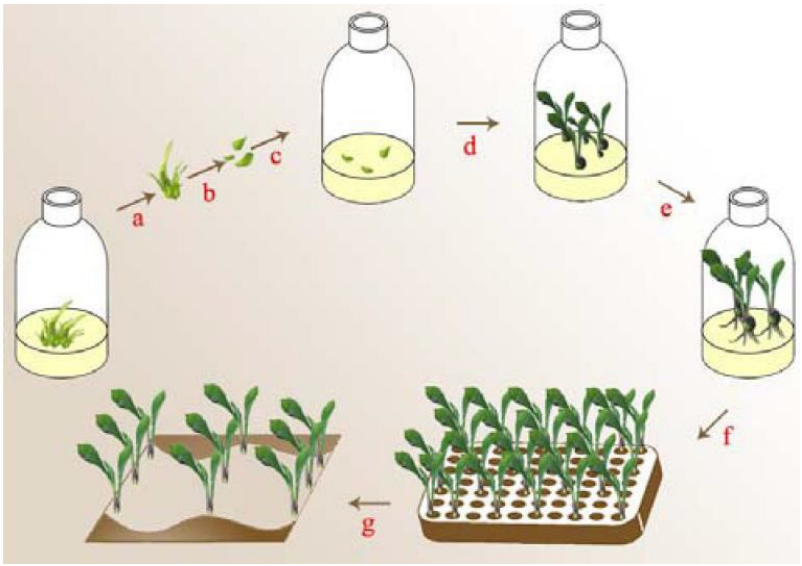
لیلیوم به عنوان چهارمین گل شاخه بریده دنیا مطرح است و روش کشت بافت، روش مناسبی را برای تکثیر این گیاه زینتی فراهم کرده است. در این پژوهش به منظور بررسی عوامل مؤثر بر باززایی لیلیوم از پیازک‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای دو آزمایش جداگانه انجام گرفت. در مرحله اول، اثر ریزنمونه‌های با لایه سلولی نازک (TCL) با ضخامت‌های 1، 3 و 5 میلی‌متر در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ترکیب‌های تنظیم کننده رشد گیاهی BA، 2ip و Kin با غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که در هر سه تیمارتنظیم کننده رشد گیاهی، بیشترین میزان اندام زایی در ریزنمونه‌هایی با ضخامت 3 میلی‌متر بدست آمد. در واقع نتایج برهمکنش اندازه ریزنمونه با تنظیم کننده رشد گیاهی موجود در محیط کشت نشان داد درصد باززایی در ریزنمونه‌های با ضخامت 3 میلی‌متر بهتر افزایش داشته است. بیشترین تعداد برگ و وزن خشک گیاهچه‌ها در محیط کشت حاوی BA مشاهده شد که نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. در آزمایش دوم به منظور بررسی اثر رقم و نوع تنظیم کننده رشد گیاهی سیتوکینین، ریزنمونه‌های TCL ارقام Robina، Donato، Nymph، Lessoto و Roxana با ضخامت 3 میلی‌متر در محیط کشت MS حاوی ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی مختلف (BA، Kin، 2ip و TDZ) با غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. نتایج نشان داد که رقم به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر اندام زایی بود. بیشترین تعداد ریشه، وزن خشک، تعداد پیازک و طول گیاهچه در رقم Roxana مشاهده شد. بررسی درصد باززایی و شاخه‌زایی در ریزنمونه‌ها نشان داد که ارقام و هورمون‌های مختلف بر میزان باززایی و ریشه‌زایی مؤثر بوده و رقم Nymph در حضور TDZ نسبت به سایر ارقام و تنظیم کننده های رشد گیاهی کمترین باززایی و ریشه‌زایی را نشان داد. همچنین مقایسه وزن خشک در تیمارهای مختلف نشان داد که وزن خشک گیاهچه‌های رقم Roxana بطور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها افزایش یافته بود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، ریزازدیادی، ریزنمونه فلس، سیتوکینین، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

لیلیوم یکی از گل‌های پیازی مهم است که به صورت گسترده‌ای در بازار جهانی و از جمله ایران استفاده می‌شود (2). زیبایی، شکل خاص و طیف رنگی گل‌ها به همراه ماندگاری نسبتاً قابل توجه آنها سبب شده است که جزو 10 گل برتر جهان قرار گرفته و از نظر تجارت گل‌های شاخه بریده، رتبه چهارم را دارا باشد (18). گیاه لیلیوم بومی مناطقی در نیمکره شمالی از جمله آسیا (چین و ژاپن)، آمریکای شمالی، اروپا (نواحی مدیترانه) و شمال آفریقا می‌باشد. تکثیر لیلیوم از طریق جدا کردن فلس‌های پیازی و پاجوش‌هایی که از خود گیاه تولید می‌شود و یا کاشت بذر انجام می‌پذیرد. اما از آنجایی که تکثیر از طریق بذر به مدت زمان زیادی نیاز داشته و هیبریداسیون جنسی این گیاه برای تولید ارقام جدید با موانع و مشکلات فراوانی همراه می‌باشد، عمدتاً ازدیاد آن از طریق تکثیر غیر جنسی انجام می‌شود (1). در سه دهه گذشته اهمیت لیلیوم به عنوان گیاه زینتی بطور فزاینده ای افزایش یافته است. در هلند سطح زیر کشت تولید پیاز های لیلیوم از 100 هکتار در سال 1966 به حدود 5000 هکتار در سال 2001 افزایش یافته و به تولید تقریبا 1000 میلیون پیاز رسیده است (20).

1 و 2- استادیاران گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی استان خراسان رضوی
(*- نویسنده مسئول: Email: ahmadsharifi66@yahoo.com)
3 و 4- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی و استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
DOI: 10.22067/jhorts4.v31i3.55475



شکل 1- ریزازدیادی لیلیوم از فلس‌های پیاز در شرایط این ویترو، a) پیاز بالغ، b) فلس‌های پیاز، c) فلس‌های کشت شده، d) شاخه‌های باززایی شده، e) گیاهچه‌های تولید شده، f) گیاهچه‌های سازگار یافته و g) گیاهان انتقال یافته به بستر کشت

Figure 1- Micropropagation of Lilium from bulb scales *in vitro*, a) bulb, b) bulb-scales, c) cultured bulb-scales, d) regenerated shoots, e) plantlets, f) acclimated plantlets, g) plants in a field

استفاده از کشت بافت برای تکثیر گونه های لیلیوم از اواخر دهه 1950 شروع شد و بلافاصله پس از آن تحقیقات زیادی در زمینه توسعه کشت بافت این گیاه انجام شد. بافت های لیلیوم عموما توانایی بالایی برای باززایی دارند اما بیشتر از پیاز به عنوان ریزنمونه برای تکثیر استفاده می شود (16). درحال حاضراندام زایی در لیلیوم پدیده غالبی است. درریزنمونه فلس پیاز، پیازک های کوچک روی بخش پایه فلس تشکیل می شود (5). شکل 1 تصویر شماتیکی از ریزازدیادی لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای را نشان می‌دهد. با وجود مشکلات بسیار در باززایی گونه‌های موجود در جنس لیلیوم از طریق تکثیر غیرجنسی، مطالعات گسترده‌ای درمورد فناوری کشت لایه‌های سلولی نازک[1] (TCL) در شرایط درون‌شیشه‌ای، به عنوان راه‌حل مناسبی جهت برطرف کردن موانع تکثیر این گیاه انجام شده است (14). از آنجایی‌که کشت لایه‌های سلولی نازک بطور گسترده در بسیاری از مطالعات مورفولوژیکی موفق بوده است، از آن به عنوان یک سیستم مدل در تکثیر گیاهان در نظر گرفته می‌شود. در این روش برش‌های نازکی از بافت اپیدرمی به همراه تعداد کمی از لایه‌های سلولی پیرامون آن به عنوان ریزنمونه در نظر گرفته می‌شود. دارا بودن اندازه کوچک ریزنمونه (از چند میکرومتر تا چندین میلی‌متر بسته به نوع اندام) موجب میانکنش کمتر بین سلول‌ها می‌شود. از این‌رو کاربرد این روش در شرایط درون‌شیشه‌ای بدلیل قرار گرفتن بیشتر سلول‌ها در معرض تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، میزان باززایی و اندام زایی را افزایش می دهد (19). از آنجایی‌که خواب پیاز یک عامل محدودکننده در باززایی پیازک گونه‌های لیلیوم است، به همین دلیل از ریزنمونه TCL که از چند لایه سلول تشکیل شده است در ترکیب با سیتوکینین برای شکستن خواب، استفاده می‌کنند (4).

اندام زایی از اندام‌های خاص ممکن است بطور مؤثری از طریق استفاده از این روش به همراه شرایط کنترل شده درون‌شیشه‌ای و کاربرد خارجی تنظیم کننده‌های رشد امکان‌پذیر باشد (19). در مطالعه‌ای که تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی گیاه لیلیوم (*Lilium ledebourii*) با استفاده از روش کشت لایه‌های سلولی نازک عرضی[2] (tTCL) مورد بررسی قرار گرفت، افزودن BA به محیط کشت باعث اندام زایی شد و تقریبا 4/4 پیازک در هر ریزنمونه تولید شد (11). علاوه بر این در روش کشت لایه‌های سلولی نازک، اندازه ریزنمونه نیز در کارایی باززایی ریزنمونه مؤثر است. نات و همکاران (2001a) نشان دادند که در کشت ساقه لیلیوم (*Lilium longiflorum*) ریزنمونه‌هایی با ضخامت 1 میلی‌متر قدرت باززایی بالاتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشتند.

علی رغم انجام کارهای گسترده تحقیقاتی در زمینه کشت بافت لیلیوم در خارج از کشور، تحقیقات صورت گرفته در داخل اندک است. بدلیل جایگاه لیلیوم در بازار داخلی و خارجی و ارزش این گیاه زینتی

1-Thin Cell Layer

2- Transverse Thin Cell Layer

و نیز واردات پیاز آن از خارج از کشور، انجام تحقیقات منسجم برای ریزازدیادی این گیاه را ضروری می‌سازد. از اینرو در این پژوهش سعی بر این است تا با بررسی و مطالعه باززایی این گیاه، بهترین پروتکل را برای تولید پیازک از ریزنمونه‌های فلس پیاز لیلیوم و با استفاده از ارقام و محیط کشت‌های متفاوت با استفاده از روش کشت لایه‌های سلولی نازک تعیین کرد. نتایج این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر در تولید انبوه و تجاری این گیاه با استفاده از روش TCL درکشور باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و ضدعفونی ریزنمونه‌ها: به منظور شکستن خواب پیاز، پیازهای تازه تهیه شده ارقام Robina، Donato، Nymph، Lessoto و Roxana از یکی از تولید کنندگان گل لیلیوم در شهر مشهد خریداری شد و پیازها به مدت یک ماه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور ضدعفونی سطحی، فلس‌های پیازهای 5 رقم لیلیوم ذکر شده پس از نیم ساعت قرار گرفتن زیر آب جاری به مدت 15 دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم 2 درصد و پس از آن به مدت 15 دقیقه با محلول کلرید جیوه 0/1 درصد تیمار شدند. شستشوی نهایی فلس‌ها با استفاده از آب مقطر استریل و در زیر هود لامینار انجام شد. بطوری‌که فلس‌های مربوط به هر یک از ارقام، 3 مرتبه به مدت 10 دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

مطالعه اثر نوع سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر اندام‌زایی: به منظور بررسی نوع سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر اندام زایی پیاز لیلیوم رقم Robina، به عنوان یک رقم تجاری که تعداد فلس زیاد و مناسبی برای کشت فراهم می‌کند، از لایه‌های سلولی نازک فلس‌ها (TCL) به عنوان ریزنمونه استفاده شد. بدین منظور فلس‌ها با ضخامت 1، 3 و 5 میلی‌متر برش خورده و در محیط کشت MS حاوی ترکیب‌های هورمونی BA، 2ip و Kin با غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA و 3 درصد ساکارز و 8 گرم در لیتر آگار کشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای 2 ± 25 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در این آزمایش ارزیابی صفاتی مانند درصد اندام‌زایی، 2 ماه پس از کشت و تعداد پیازک، تعداد ریشه، تعداد برگ، ارتفاع گیاهچه و وزن خشک گیاهچه بعد از 4 ماه از کشت صورت گرفت.

بررسی نوع و ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی و رقم بر باززایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم: به منظور بررسی اثر نوع سیتوکینین بر باززایی ارقام مختلف، از پنج رقم Robina، Donato، Nymph، Lessoto و Roxana استفاده شد. بهترین اندازه ریزنمونه بر اساس نتایج آزمایش اول انتخاب شد و ریزنمونه‌ها درمحیط‌کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی مختلف (BA، Kin، 2ip و TDZ) با غلظت 1 میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA و 3 درصد ساکارز و 8 گرم در لیتر آگارکشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها به اتاق رشد با شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای 2 ± 25 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. هر دو هفته یک‌بار ریزنمونه‌ها واکشت شده و به محیط کشت جدید با ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی مشابه با محیط کشت اولیه منتقل شدند. در این آزمایش اثر نوع سیتوکینین، رقم و اثر متقابل هر دو عامل بر گیاهچه‌های تولید شده با بررسی صفاتی مانند درصد اندام زایی دو ماه پس از کشت و تعداد پیازک، تعداد ریشه، طول گیاهچه، درصد ریشه‌زایی و وزن خشک 4 ماه بعد از کشت ارزیابی شد.

سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده: گیاهچه‌های باززایی شده به لیوان‌های یکبار مصرف حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت 1:1 منتقل شدند. به عنوان تأمین رطوبت لازم جهت حفظ و نگهداری گیاهچه‌ها از لیوان یکبار مصرف شفاف به عنوان درپوش استفاده شد. به منظور زهکشی مناسب و سازگاری بهتر گیاهچه‌ها، سوراخ‌هایی در انتهای لیوان‌ها ایجاد شد. پس از یک ماه به منظور سازگاری بهتر گیاهچه‌ها با شرایط محیطی، درپوش‌ها برداشته شد. گیاهچه‌های شاداب پس از 45 روز به گلدان انتقال داده شده و در شرایط دمایی و رطوبتی گلخانه نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری JMP8 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد ارزیابی شده و نمودارها با استفاده از برنامه Excell رسم شدند. تبدیل داده‌های درصدی با استفاده از arcsin انجام شد و سپس تجزیه واریانس با داده‌های تبدیل شده صورت گرفت.

نتایج و بحث

بررسی نوع سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر اندام‌زایی لیلیوم

بررسی تأثیر سیتوکینین‌های مختلف (BA، 2ip و Kin) بر پارامترهای باززایی نشان داد که بیشترین درصد اندام زایی (85 درصد) در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد گیاهی BA بدست آمد که با 2ip تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین درصد باززایی (51/77 درصد) در تیمارهای حاوی Kin مشاهده شد (جدول 1). تحقیقات انجام شده نیز بیانگر تأثیر زیاد تنظیم کننده رشد گیاهی BA بر درصد باززایی ریزنمونه‌های لیلیوم است (3، 8 و 20). همچنین شمارش تعداد برگ گیاهچه‌های باززا شده، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تنظیم کننده های رشد گیاهی مختلف بود. بطوری‌که گیاهان باززا شده در محیط کشت حاوی BA بیشترین تعداد برگ را

داشتند. بر خلاف تعداد برگ، ارتفاع گیاهچه‌ها، تحت تأثیر هورمون‌های مختلف قرار نگرفت، بطوری‌که ارتفاع گیاهچه‌ها در محیط کشت حاوی هر یک از سه نوع تنظیم کننده رشد گیاهی BA، 2ip و Kin تفاوت معنی‌داری نداشت. این امر نشان می‌دهد که افزایش طول برگ گیاهچه‌های باززا شده لیلیوم تحت تأثیر نوع تنظیم کننده رشد گیاهی سیتوکینین قرار نگرفته است (جدول 1). نتایج حاصل از اندازه‌گیری تعداد پیازک و تعداد ریشه در محیط کشت‌های حاوی سه نوع تنظیم کننده رشد گیاهی BA، 2ip و Kin نشان داد که از نظر تولید پیازک بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد اما بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت حاوی 2ip و کمترین میزان تولید ریشه در حضور BA مشاهده شد (جدول 1). در آزمایشی که به منظور بررسی اثر نوع سیتوکینین و اکسین بر باززایی گیاه لیلیوم (*lilium longiflorum*) انجام شد، گزارش شد که استفاده ازBA سبب تمایز فلس پیاز شده و تشکیل پیازک را را تحریک کرد اما مانع تشکیل ریشه شد (15). اندازه‌گیری وزن خشک گیاهچه‌های رشد یافته در حضور تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BA، 2ip و Kin نشان داد که که بیشترین وزن خشک گیاهچه‌ها (0/17 گرم) در محیط کشت حاوی BA بدست آمد که با Kin تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین وزن خشک (0/11 گرم) در تیمارهای حاوی 2ip مشاهده شد.

جدول 1- اثر نوع سیتوکینین بر شاخص‌های باززایی ریزنمونه TCL گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای

Table 1- Effect of cytokinin on regeneration parameters of TCL explant of *Lilium* spp. under *In vitro* condition

		اندام‌زاییOrganogenesis (%)	تعداد پیازک Bulblet no	تعداد ریشه Root no	تعداد برگ Leaf no	ارتفاع گیاهچه Plantlet height (cm)	وزن خشک Dry weight (g)
تنظیم کننده رشد گیاهی Plant growth regulator	BA	85 a	9.88 a	6.66 b	34.22 a	7 a	0.16 ab
	2ip	62.77 ab	9.11 a	14.66 a	18.44 b	8.5 a	0.11 b
	Kin	51.77 b	8.33 a	8.88 b	19.22 b	9 a	0.17 a

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$) based on LSD test

در بخش دیگر این آزمایش تأثیر ضخامت ریزنمونه TCL (1، 3 و 5 میلی‌متر) بر اندام‌زایی گیاه لیلیوم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اندازه‌های مختلف ریزنمونه بطور معنی‌داری، درصد اندام زایی و وزن خشک را تحت تأثیر قرار دادند. بطوری‌که بیشترین درصد اندام‌زایی (100 درصد) و وزن خشک (0/2 گرم) در ریزنمونه‌هایی با ضخامت 3 میلی‌متر مشاهده شد (جدول 2). در مورد سایر صفات نیز ریزنمونه‌هایی با ضخامت 3 میلی‌متر بیشترین تأثیر را در تولید پیازک، ریشه، برگ و ارتفاع گیاهچه داشتند، بطوری‌که صفات فوق در ریزنمونه‌هایی با ضخامت 1 و 3 میلی‌متر با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند اما با ضخامت 5 میلی‌متر تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (جدول 2). به نظر می‌رسد برهمکنش ریزنمونه با محیط کشت و قرار گرفتن در معرض هورمون‌ها در ریزنمونه‌های با ضخامت 3 میلی‌متر در حد مناسبی حفظ می‌شود که در نهایت منجر به افزایش درصد اندام‌زایی شده است.

جدول 2- اثر اندازه ریزنمونه بر شاخص‌های باززایی گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2- Effect of explant size on regeneration parameters of *Lilium* spp. under *In vitro* condition

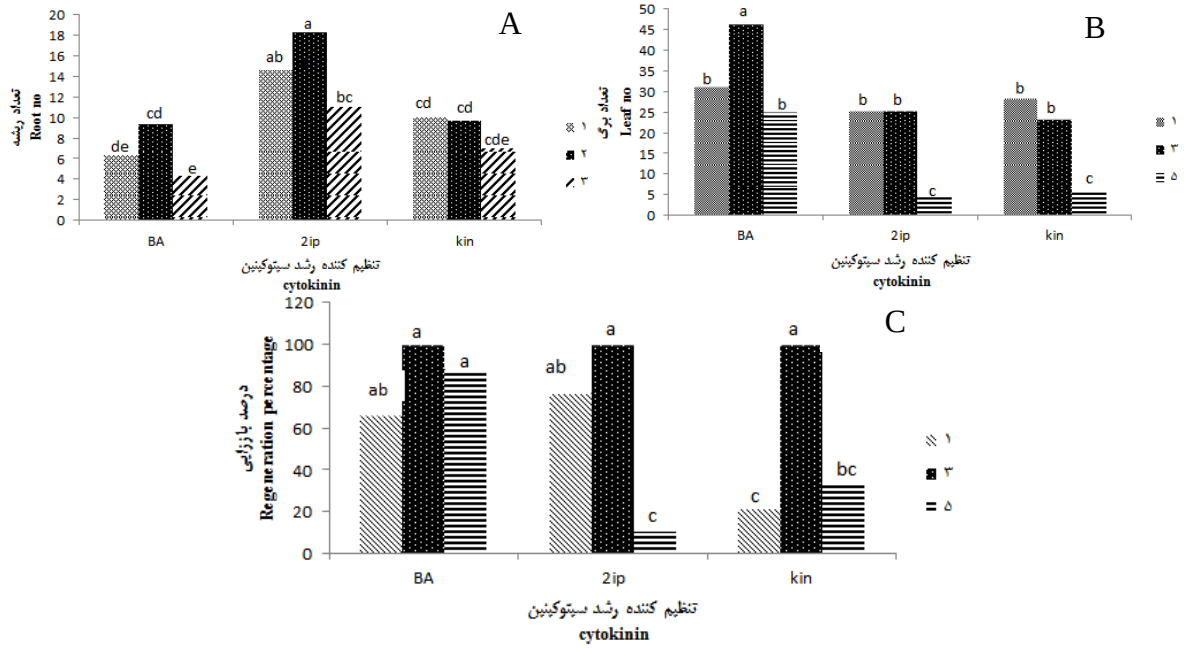
		درصداندام‌زایی Organogenesis (%)	تعداد پیازک Bulblet no	تعداد ریشه Root no	تعداد برگ Leaf no	ارتفاع گیاهچه Plantlet height (cm)	وزن خشک Dry weight (g)
اندازه ریزنمونه Explant size (mm)	1	55.22b	9.77a	10.33a	28.33a	8.83a	0.14b
	3	100a	10.55a	12.44a	31.66a	10.05a	0.2a
	5	44.33b	7b	7.44b	11.88b	5.61b	0.09c

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$) based on LSD test

بررسی اثر متقابل ضخامت ریزنمونه (1، 3 و 5 میلی‌متر) و نوع سیتوکینین (BA، 2ip و Kin) نشان داد که ریزنمونه‌هایی با ضخامت 3 میلی‌متر در تیمار 2ip بیشترین تعداد ریشه و در محیط کشت حاوی BA بیشترین تعداد برگ را داشتند که نسبت به سایر تیمارها تفاوت

معنی‌داری را نشان دادند. همچنین ریزنمونه‌های 3 میلی‌متری در تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی هر سه نوع سیتوکینین نسبت به ریزنمونه‌هایی با قطر 1 و 5 میلی‌متر بیشترین درصد اندام زایی را نشان دادند اما تفاوت معنی‌داری در درصد اندام زایی ریزنمونه‌ها با ضخامت مختلف در محیط کشت حاوی BA و 2ip مشاهده نشد (شکل 2).



شکل 2- اثر نوع تنظیم کننده رشد گیاهی سیتوکینین و اندازه ریزنمونه بر، A) تعداد ریشه، B) تعداد برگ، C) درصد باززایی لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای. اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.05) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Figure 1- Effects of cytokinin and explant size on A) root no, B) leaf no, C) Regeneration percentage of *Lilium* spp. under *in vitro* condition.

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.05) based on LSD test

بررسی نوع ترکیب هورمونی و رقم بر اندام‌زایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم

با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل رقم و نوع تنظیم کننده رشد گیاهی بر اندام زایی گیاه لیلیوم در آزمایشات مختلف (7، 9) آزمایش دوم به منظور بررسی اثر نوع تنظیم کننده رشد سیتوکینین و رقم و اثر متقابل این عوامل بر یکدیگر بر شاخص‌های باززایی در این گیاه انجام شد. طبق داده‌های بدست آمده، بین ارقام مختلف از نظر شاخص‌های باززایی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p\leq0/01$). بطوری‌که رقم Roxana با تعداد 8 ریشه در هر ریزنمونه و وزن خشکی معادل 0/627 گرم بیشترین تأثیر را نسبت به سایر ارقام نشان داد اما کمترین درصد اندام زایی (83/3 درصد) و ریشه‌زایی (83/3 درصد) در رقم Nymph مشاهده شد که با درصد اندام زایی و ریشه‌زایی سایر ارقام تفاوت معنی‌داری داشت (جدول 3). نوع رقم به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر شاخص‌های باززایی مشخص شده است. بطوری‌که تحقیقات انجام شده به منظور بررسی باززایی 3 رقم لیلیوم نشان‌دهنده تفاوت در وزن خشک گیاهچه‌های ارقام مختلف این گیاه است (7).

علاوه بر آن در بین ارقام مورد مطالعه، بیشترین تعداد پیازک در رقم Roxana بدست آمد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p\leq0/01$) (جدول 3). تفاوت تولید پیازک ارقام مختلف گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای در بسیاری از آزمایشات به اثبات رسیده است (12، 6). اثر رقم نیز بر طول گیاهچه‌های باززا شده معنی‌دار بود ($p\leq0/01$). طبق این نتایج، ارقام Roxana و Donato به ترتیب با 5 و 4/85 سانتی‌متر، بیشترین طول را نشان دادند (جدول 3).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های باززایی نشان داد که کاربرد چهار نوع تنظیم کننده رشد TDZ، 2ip، BA و Kin تأثیر معنی‌داری بر درصد باززایی، درصد ریشه‌زایی، طول گیاهچه، تعداد ریشه و وزن خشک گیاهچه‌ها در سطح احتمالی 5 درصد داشته است. بطوری‌که کاربرد تنظیم کننده رشد گیاهیBA، Kin و TDZ به ترتیب بیشترین افزایش را در وزن خشک گیاهچه‌ها، طول آن و تولید ریشه داشته است که از لحاظ آماری نسبت به سایر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول 4). در واقع

استفاده از BA سبب القای تولید پیازک شده که منجر به افزایش وزن خشک می‌شود اما مانع تشکیل ریشه خواهد شد که با نتایج نات و همکاران (15) مطابقت دارد. طبق نتایج این آزمایش، کاربرد سیتوکینین‌های مختلف بر صفاتی نظیر درصد باززایی مؤثر بوده است، بطوری‌که درصد باززایی و تولید گیاهچه در ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی 2ip به میزان بالایی صورت گرفت که با BA و Kin تفاوتی نداشت اما TDZ بطور معنی‌داری گیاهچه کمتری تولید کرد (جدول 4). گزارش‌های ارائه شده نیز بیانگر تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر بهبود درصد اندام زایی است (6 و 17).

جدول 3- اثر رقم بر شاخص‌های باززایی ریزنمونه TCLگیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3- Effect of cultivar on regeneration parameters of TCL explant of *Lilium* spp. under *in vitro* condition

		اندام‌زایی Organogenesis (%)	تعداد پیازک Bulblet no	طول گیاهچه Plantlet length (cm)	ریشه‌زایی Rooting (%)	تعداد ریشه Root no	وزن خشک Dry weight (g)
رقم Cultivar	Lesoto	100a	6.66a	3.70b	100a	5.41b	0.37b
	Donato	100a	4.75c	4.87a	100a	4.66b	0.31bc
	Roxana	97.16a	7.66a	5a	97.16a	8a	0.62a
	Nymph	83.33b	6.41ab	3.29b	83.33b	5.25b	0.26c
	Robina	100a	4.83bc	3.45b	100a	4.66b	0.25c

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.05) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.05) based on LSD test

با وجود گزارش‌های ارائه شده مبنی بر تفاوت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف در تولید پیازک (17، 10 و 7)، تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای مورد بررسی در این آزمایش از لحاظ تعداد پیازک مشاهده نشد. این امر نشان می‌دهد که تولید پیازک در ریزنمونه‌های گیاه لیلیوم در شرایط این ویترو تحت تأثیر نوع سیتوکینین قرار نگرفته است.

جدول 4- اثر نوع سیتوکینین بر شاخص‌های باززایی ریزنمونه TCL گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای

Table 4- Effect of cytokinin on regeneration parameters of TCL explant of *Lilium* spp. under *in vitro* condition

		اندام‌زایی Organogenesis (%)	تعداد ریشه Root no	طول گیاهچه Plantlet lenght (cm)	وزن خشک Dry weight (g)
تنظیم کننده رشد گیاهی plant growth regulator	TDZ	91.06b	6.66a	4.06b	0.27b
	2ip	100a	5.46b	4.16b	0.33b
	BA	100a	4.8b	3.1c	0.53a
	Kin	93.33ab	5.46b	4.93a	0.32b

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.05) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns (P<0.05) based on LSD test

نتایج تجزیه واریانس داده‌های این آزمایش نشان داد که اثر متقابل رقم و نوع سیتوکینین بر درصد باززایی، تعداد پیازک و درصد ریشه‌زایی، طول گیاهچه، تعداد ریشه و وزن خشک گیاهچه در سطح احتمال 5 درصد معنی‌دار بود. بررسی درصد باززایی و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها نشان داد که ارقام و هورمون‌های مختلف بر میزان باززایی و ریشه‌زایی مؤثر بوده است، بطوری‌که رقم Nymph در حضور هورمون TDZ و Kin نسبت به سایر ارقام و هورمون‌ها کمترین باززایی و ریشه زایی را نشان داد (جدول 5). بر خلاف نوع تنظیم کننده رشد گیاهی مورد استفاده که به تنهایی تأثیر معنی‌داری در تولید پیازک نداشت، اما اثر متقابل نوع تنظیم کننده رشد گیاهی و رقم موجب تفاوت در تولید پیازک در ریزنمونه‌های گیاه لیلیوم شد، بطوری‌که ریزنمونه‌های حاصل از رقم Nymph در حضور هورمون BA بیشترین پیازک را تولید کردند (جدول 5).

مقایسه وزن خشک در تیمارهای مختلف نشان داد که وزن خشک گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه‌های رقم Roxana در محیط کشت حاوی هورمون BA، بیشترین مقدار بود ($p\leq 0/01$) (جدول 5). در تحقیقی توانایی باززایی ارقام اورینتال گیاه لیلیوم (Lilium spp.) مورد مقایسه قرار گرفت. طبق نتایج این آزمایش، بیشترین درصد تشکیل پیازک (84 درصد) در رقم Aubade در محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. همچنین در این رقم وزن پیازک 6/7 افزایش یافته بود که نسبت به سایر ارقام بیشتر بود (9).

جدول 5- اثر متقابل رقم و نوع هورمون بر خصوصیات رشدی گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای

Table 5- Interaction of cultivar and cytokinin on growth characteristics of Lilium spp. under *in vitro* condition

رقم Cultivar	هورمون Hormon	اندام‌زایی Organogenesis (%)	تعداد پیازک Bulblet no	طول گیاهچه Platlet length (cm)	ریشه‌زایی Rooting (%)	تعداد ریشه Root no	وزن خشک Dry weight (g)
Lesoto	TDZ	100a	6bcde	4abcd	100a	6de	0.263def
	2ip	100a	8abcd	4abcd	100a	5.66de	0.28def
	BA	100a	5.66 cde	1.83efg	100a	3.66fg	0.643b
	kin	100a	7bcde	5ab	100a	6.33cde	0.326cdef
Donato	TDZ	100a	5de	5ab	100a	6.66bcd	0.323cdef
	2ip	100a	6bcde	5.66a	100a	5def	0.24def
	BA	100a	4e	3.16cdef	100a	1h	0.21def
	kin	100a	4e	5.66a	100a	6de	0.366cdef
Roxana	TDZ	88.66a	6bcde	4abcd	88.66a	9a	0.29def
	2ip	100a	7bcde	4.66abc	100a	6.66bcd	0.54bc
	BA	100a	9ab	5.66a	100a	8.33ab	1.226a
	kin	100a	8.66abc	5.66a	100a	8abc	0.453bcd
Nymph	TDZ	66.66b	4e	4.66abc	66.66b	5.33def	0.216ef
	2ip	100a	6.66bcde	1.5fg	100a	5def	0.433bcde
	BA	100a	10.66a	3.66bcd	100a	6de	0.173f
	kin	66.66b	4.33e	3.33bcde	66.66b	4.66ef	0.246def
Robina	TDZ	100a	4e	2.66defg	100a	6.33cde	0.3def
	2ip	100a	6bcde	5ab	100a	5def	0.203f
	BA	100a	4.33e	1.16g	100a	5def	0.3def
	kin	100a	5de	5ab	100a	2.33gh	0.223ef

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) با استفاده از آزمون LSD نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$) based on LSD test

نتیجه‌گیری کلی

در سال‌های اخیر به دلیل محدودیت‌های تکثیر سنتی گیاه لیلیوم بویژه گسترش انتقال بیماری‌ها و استقبال بسیار زیاد از این گیاه و همچنین خروج مبالغ زیاد ارز جهت واردات پیاز لیلیوم سبب شده است تا کشت بافت این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار شود. لذا ضرورت تحقیق و توسعه روش مناسب جهت ریزازدیادی و کشت بافت این گیاه در داخل کشور احساس می‌شود. در این آزمایش بطور موفقیت‌آمیزی از ریزنمونه‌های TCL پیاز لیلیوم جهت باززایی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد که به عنوان روشی مؤثر در باززایی و تولید گیاه لیلیوم تلقی می‌شود. با استفاده از این روش و بررسی پارامترهایی مانند تنظیم کننده‌های رشد، ضخامت ریزنمونه و نوع رقم مورد استفاده می‌توان به شرایط مناسب برای باززایی این گیاه دست یافت. بطوری‌که بهترین محیط کشت برای باززایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم با ضخامت 3 میلی‌متر، محیط کشت MS حاوی 1 میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA در نظر گرفته شد.

منابع

1- Anderson N.O. 2007. Flower Breeding & Genetics (Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century). Springer Science & Business Media, Netherlands.

2- Azadi P., and Mojtahedi N. 2009. Effect of growth regulators, sucrose concentration and scale segment on micropropagation of *Lilium ledebourii* in winter harvest bulbs. *In Agronomy and Horticulture*.

3- Bacchetta L., Remotti P.C., Bernardini C., and Sccardof F. 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stemnodes of lilium. Plant Cell Tissue Culture, 74: 37-44.

4- Bui V. L., Nhut D. T.,and Tran Thanh Van K. 1999. Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblet explants of *Lilium longiflorum in vitro*. Comptes Rendus Acadmic Science Paris, 322:303-310.

5- Hohtola A., Haggman H., Bach A., and Tahvonen R. 2005. Biotechnological Approaches in Lily (*Lilium*) Production. Oulu University Press.

6- Kapoor R., Kumar S., and Kanwar J. K. 2008. Bulblet production from node explants grown *in vitro* in hybrid

lilies. International Journal of Plant Production, 3: 125- 134.
7- Khanghaei L. 2013. Study of explants position, culture medium type and plant growth regulators effects on lilium's bulbs (Oriental and OT Hybrids) regeneration In Vitro. Master's thesis, Islamic Azad University of Mashhad. (in Persian with English abstract)
8- Kumar S., Awashthi V., and Kanwar J.K. 2007. Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *in vitro* bulblet formation and growth in oriental lily. Horticultural Science, 34:77-83.
9- Lojic M., Vinterhalter B., Subotic A., and Vinterhalter D. 2015. Differences in regenerative capacity of Oriental lily (*Lilium* spp.) cultivars. Botanica Serbica, 39:159-167.
10- Mengli X., Sun L., Qiu Sh., Liu J., and Xu J. 2012. *In vitro* mutagenesis and identification of mutant via ISSR in lily (*Lilium lingiflorum*). Plant Cell Reports, 31: 1043-1051.
11- Mirmasoumi M., Azadi P ., Sharafi A., Ntui V.O., and Mii M. 2013. Simple protocol for plant regeneration of *Lilium ledebourii* using transverse thin cell layer. Progress in Biological Sciences, 3: 117-122.
12- Mojtahedi N., and Azadi P. 2009. Comparision of *in vitro* bulblet production in two comercial *lilium* cultivars, *lilium longiflorum* cv. Gironde and *lilium longiflorum* cv. Cassandra. Journal of seed, 24: 721-738 (in persian).
13- Nhut D.T., Van Le B., Fukai S., Tanaka M., and Van K.T.T. 2001a. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regulation, 33:59-65.
14- Nhut D.T., Le B.V., Teixeira Da Silva J.A., and Aswath C. R. 2001b. Thin cell layer culture system in lilium: regeneration and transformation Perspectives. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant, 37:516-523.
15- Nhut D.T., Van Le B., Tran Thanh Van K. 2003. Manipulation of morphogenetic pathways of *lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plants, 37: 44-49.
16- Niimi Y., Han D.S., and Makoto F.2001. Production of virus-free plantlets by anther culture of *Lilium* x 'Enchantment'. Scientia Hortic, 90: 325-334.
17- Paric A., Cakar J., Muratovic E., and Kralija B. 2011. Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered *lilium bosnicum* (G. Beck) ex Fritsch. Botanica Serbica, 35:31-35.
18- Thakur R., Sood A., and Nagar P. 2006. Regulation of growth of *lilium* plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: growth parameters. Plant Cell Reports, 25: 382-391.
19- Teixeira da Silva J.A. 2003. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology, 12: 683-691.
20- Van Tuyl J.M., and Van Holsteijn H.M.C. 1996. Lily breeding research in the Netherlands. Acta Horticulture, 414: 35-46.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 3, Fall 2017, P. 555-564
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 31، شماره 3، پاییز 1396، ص. 564-555
شاپا: 2008 - 4730

Effect of Cultivar and Plant Growth Regulators on *Invitro* Regeneration of *Lilium* Spp. Utilizing Thin Cell Layer Explants

A. Sharifi[1*]- F. Keykha Akhar[2]- M. Yazdi[3]- A. Bagheri[4]

Received: 19-06-2016
Accepted: 30-06-2017

Introduction: Lily (*Lilium* spp.) is a genus of herbaceous flowering plants, which consisted of many beautiful ornamental species with large prominent flowers. Most species are native to the Northern hemisphere temperate, though their range extends into the Northern subtropics. Some specific hybrids of *Lilium* spp. have been developed as cut flower in controlled conditions and in some cases can be grown as pot plant. Propagation rate of lily in natural clonal propagation methods is very low and one year produces of 1-2 bulblets per bulb scale. There is also possibility of disease transmission; so that, tissue culture techniques has provided an efficient method for its micropropagation.

Materials and Methods: In this study, two separate experiments under *In vitro* conditions the bulblet regeneration from thin cell layer (TCL) explants of *Lilium* spp. was investigated. In the first experiment, after two months the effect of TCL explants with 1, 3 and 5 mm thickness on MS medium containing 1 mg/l BA, 2ip and kin in combination with 0.5 mg/l NAA on regeneration parameters were assayed. In the second experiment to determine the effect of cultivar and cytokinin types, 3mm thickness TCL explants of five cultivars (Robina, Donato, Nymph, Lessoto and Roxana) were tested on MS medium containing different plant growth regulator (PGR) compounds including BA, kin, 2ip and TDZ at concentration of 1 mg/l in combination with 0.5 mg/l NAA. The regeneration parameters were assayed after four months. In all experiments, the medium was adjusted to pH 5.8 and autoclaved at 121 $^{\circ}C$ for 15 min. All cultures were incubated at 25 ± 2 $^{\circ}C$ with a 16 h photoperiod under cool white flourescent lights (30 µmol/m^2).

Results and Discussion: According to the first experiment results, plant growth regulator of BA in all of surveyed parameters except root number was better than other PGRs and explants with 3 mm thickness was the best in all of parameters. The interaction of PGR and explants was significant, however maximum bulblet regeneration was observed in TCL explants with 3 mm thickness in all of PGR treatments (100%). While 1 mm thickness TCL in 2ip and 1 and 5 mm thickness TCL in Kin had the least regeneration percentage. Results revealed that the interaction of explants and medium is a key factor for suitable establishment, regeneration and growth of TCLs. Bulb dormancy is one of the limiting factors in regeneration of bulbous crop species. It seems under *In vitro* condition explants size and PGR combination of media especially cytokinin affected on breaking of dormancy. Maximum number of leaves and dry weight of bulblets in medium containing BA was significantly higher compared with other treatments. Most of studies confirmed the positive effect of BA on regeneration of lily. The function of cytokinin in plant promoted cell division and differentiation, which lead to growth and maintaining cells in meristematic status.

Result of second experiment showed that cultivar was one of the effective factors on regeneration trait. Oriental lily cultivar "Roxana" had the highest number of roots, bulblets, dry weight and length of plantlets and "Nymph" cultivar showed the lowest percentage of regeneration, dry weight, length of plantlets and rooting obtained. In all of cultivars BA induced more organogenesis percentage and plantlet dry weight, while TDZ induced more rooting percentage. The interaction of cultivar and PGR treatments on percentage of regenerated bulblets and rooting were significant. "Nymph" cultivar had minimum percentage of regeneration and rooting in medium containing TDZ and Kin. Furthermore, "Roxana" cultivar in medium containing BA showed the best dry weight comparison to other treatments.

Conclusion Lily has widely used in the floral industry as a cut flower or potted plant. In recent years, tissue culture was developed as reliable and highly effective method to overcome its limitations of vegetative propagation. The most advantage of this method is high multiplication rate and disease free propagation. In this

1 and 2- Assistant Professors, Ornamental Plant Biotechnology Department, Academic Center for Education, Culture and Research, Branch of Khorasan Razavi
(*- Corresponding Author Email: ahmadsharifi66@yahoo.com)
3 and 4- PhD Student of Agricultural Biotechnology and Professor, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad

study, bulblet regeneration of *lilium* Spp. from TCL explants under *in vitro* condition was considered as a highly efficient procedure for its micropropagation. With optimization of TCL system some parameters such as exogenously applied plant growth regulators, cultivar, explants types were investigated. Favorable conditions for bulblet regeneration were achieved with 3 mm thickness TCLs in MS medium containing 1 mg/l BA with 0.5 mg/l NAA. This protocol can be used for rapid micropropagation of many cultivars.

Keywords: Auxin, Bulb explant, Cytokinin, *In vitro* culture, Micropropagation