

بهینه‌سازی شرایط کشت درون‌شیشه‌ای گیاه نسرین (آماریلیس) (*Hippeastrum × johnsonii*)

سیده مهدیه خرازی^{۱*}، علی تهرانی‌فر^۲، احمد شریفی^۱، سید حسین نعمتی^۳ و عبدالرضا باقری^۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸)

چکیده

گیاه نسرین (آماریلیس) یکی از گیاهان پیازی ارزشمند است. سرعت تکثیر این گیاه در شرایط طبیعی پایین است. بنابراین کاربرد روش‌های نوین مانند کشت بافت راهکاری مناسب برای افزایش ضریب تکثیر این گیاه زینتی است. در این پژوهش به منظور بررسی اثر نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین بر میزان باززایی ریزنمونه‌های گیاه آماریلیس، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. ریزنمونه‌ها شامل فلس جفتی همراه با صفحه پایگاهی، فلس تکی همراه با صفحه پایگاهی و فلس تکی بدون صفحه پایگاهی بودند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و یا تیدبازورون (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) همراه با ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هشت گرم در لیتر آگار کشت شدند. نتایج نشان داد ریزنمونه‌های فلس جفتی همراه با صفحه پایگاهی در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها، ریزنمونه‌های مناسب‌تری برای تکثیر گیاه آماریلیس در شرایط درون‌شیشه‌ای هستند و پیازچه‌های قطورتری را تولید می‌کنند. از سوی دیگر در ریزنمونه‌های فلس تکی هیچ‌گونه پیازچه‌ای باززایی نشد و به مرور زمان، ریزنمونه‌ها قهوه‌ای‌رنگ شدند. همچنین نوع تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین تأثیر معنی‌داری بر قطر پیازچه‌های باززایی شده نداشت ولی در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد BA، تعداد پیازچه بیشتری در مقایسه با محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد TDZ باززایی شدند. محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد، پیازچه‌های کمتر و قطورتری در مقایسه با سایر تیمارها ایجاد کرد. با در نظر گرفتن صفات قطر و تعداد پیازچه، کاربرد ریزنمونه‌های فلس جفتی و استفاده از محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA برای تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه آماریلیس توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آماریلیس، پیازچه، تکثیر، سیتوکینین، فلس جفتی

۱. استادیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

۲ و ۳. به ترتیب استاد و استادیار، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴. استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: ma_kh230@yahoo.com

مقدمه

آماریلیس (*Hippeastrum × johnsonii*) یکی از زیباترین گل‌های شاخه‌بریده و گلدانی است که بیشترین میزان تقاضا برای خرید آن در تعطیلات کریسمس است (۱۰ و ۴۱) و به دلیل اهمیت آن در این ایام، مورد توجه بسیاری از تولیدکنندگان گل در جهان قرار گرفته است. عمده‌ترین مصرف آن در ایران نیز پیش‌رس کردن گیاه برای استفاده در عید نوروز است (۲۶). این گیاه در سال ۲۰۰۹، با فروش ۳۶ میلیون پوند در هلند، رتبه نهم را در بین گل‌های شاخه‌بریده هلند به خود اختصاص داد و بر اساس طبقه‌بندی اتحادیه اروپا، به‌عنوان هشتمین گل شاخه‌بریده مهم مطرح شد (۳۳). از این‌رو ارزش اقتصادی بالای تولید و تکثیر این گیاه، گواهی بر اهمیت تکثیر، تولید و پرورش چنین گیاهی در صنعت باغبانی جهان است. این گیاه توسط بذر، پیازچه‌های پاجوش و روش فلس‌برداری تکثیر می‌شود (۳۵). تکثیر این گیاه با روش جنسی جنبه تجاری نداشته و اغلب به‌منظور تولید ارقام جدید به‌کار می‌رود (۶). در شرایط عادی تعداد پیازچه‌های پاجوش تولید شده، بسیار کم است. همچنین در روش‌های تجاری نیز تعداد پیازچه‌های تولید شده از روند قابل توجهی برخوردار نیست. بنابراین به‌دلیل ارزش اقتصادی پیاز این گیاه زینتی (۲۱)، به‌نظر می‌رسد استفاده از روش‌های تکثیر درون‌شیشه‌ای برای ازدیاد آماریلیس اجتناب‌ناپذیر باشد، چرا که با استفاده از روش‌های ریزازدیادی می‌توان از یک پیاز بالغ تعداد زیادی پیازچه به‌دست آورد که از لحاظ تجاری اهمیت فراوانی دارد (۴۳).

مروری بر نتایج پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که از ریزنمونه‌های مختلفی چون قاعده برگ (۳۴)، گلپایه (Scape) (۴۳)، فلس‌های پیاز (۲۵)، فلس‌های جفتی (۴۰ و ۴۶)، دمگل (۳۴)، دمگل‌چه (۱۶) و تخمک (۱۷) برای ریزازدیاد آماریلیس استفاده شده است. با این حال برخی معتقدند که بهترین ریزنمونه برای کشت درون‌شیشه‌ای، فلس‌های جفتی یا گلپایه جوان هستند (۳۵). با این حال ریزنمونه گلپایه جوان همیشه در دسترس نیست. زیرا از این نوع ریزنمونه زمانی باید

استفاده کرد که گیاه در مرحله رشد رویشی فعال باشد (۶). در گیاه آماریلیس روش تکثیر با فلس جفتی نسبت به تک‌فلس متداول‌تر است (۱ و ۱۴). از سوی دیگر حضور بافت صفحه پایگاهی نقش مهمی در میزان باززایی پیازچه‌ها دارد (۳۰). با این حال می‌توان همکاران (۲۵) گزارش کردند که قسمت‌های میانی فلس‌ها که فاقد صفحه پایگاهی و بافت‌های متصل به آن هستند، نیز می‌توانند اندام‌های جدیدی را در شرایط درون‌شیشه‌ای ایجاد کنند. از این‌رو به‌نظر می‌رسد حضور فلس‌های جفتی برای پرآوری آماریلیس الزامی است و می‌توان ریزنمونه‌های دیگری را نیز برای پرآوری استفاده کرد. از ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی مختلفی نظیر (N6-Benzyladenine) BA، (Kin) Kin، (Thidiazuron) TDZ و (N6-2-Isopentenyladenine) Zip باززایی ریزنمونه‌های آماریلیس در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده شده است (۹، ۱۸، ۴۴ و ۴۶). اما کاربرد ترکیب تنظیم‌کننده رشدی BA همراه با NAA نسبت به سایر تنظیم‌کننده‌های رشدی متداول‌تر است (۵، ۱۹ و ۳۴). اسلم و همکاران (۵) توانایی باززایی ریزنمونه فلس پیاز آماریلیس را در شرایط درون‌شیشه‌ای ارزیابی کردند و برای القای تشکیل پیازچه در ریزنمونه‌ها، محیط کشت MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA همراه با ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA را توصیه کردند. همچنین نتایج پژوهش آنها نشان داد که بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشدی برای پرآوری شاخساره‌ها، محیط کشت MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA در ترکیب با ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد NAA است. سیدیکو و همکاران (۳۶) با بررسی اثر اندازه ریزنمونه فلس جفتی و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد را بر کشت درون‌شیشه‌ای آماریلیس، نشان دادند که بیشترین میزان تشکیل پیازچه در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ریزنمونه فلس جفتی با طول ۲/۵ سانتی‌متر و عرض یک سانتی‌متر به‌دست می‌آید.

از این‌رو با توجه به وجود گزارش‌های متفاوت در

- تأمین رطوبت ۷۵ درصدی گلخانه با آبیاری روزانه سطح گلخانه
- مراقبت از گیاهان به‌منظور کنترل آفات و بیماری‌ها

انتخاب و ضدعفونی مواد گیاهی

برای اجرای پژوهش، در اواخر فصل زمستان، پیازهایی با مشخصات ظاهری یکسان از لحاظ قطر و طول (قطر تقریبی ۵-۷ سانتی متر و طول تقریبی ۵-۷ سانتی متر) انتخاب شدند. پس از انتقال پیازها به آزمایشگاه به‌منظور ضدعفونی مواد گیاهی، ابتدا فلس‌های آسیب‌دیده و آلوده حذف شدند و سپس پیازها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع شوینده رایج شستشو داده شدند تا گرد و غبار و همچنین مواد زائد دیگر از سطح آن برطرف شود. پس از این مرحله، از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه برای از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی استفاده شد و پس از انتقال بشر حاوی پیازها به زیر هود لامینار و آبکشی با آب مقطر استریل، برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی از محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. به‌منظور کاهش کشش سطحی و افزایش سطح تماس پیاز و ماده گندزدا، بسته به حجم محلول گندزدا دو تا سه قطره توبین ۲۰ به محلول ضدعفونی اضافه شد. طی مدت ضدعفونی و به‌منظور بهبود تماس گیاه با ماده گندزدا، محلول با دست تکان داده شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها در شرایط استریل در زیر هود لامینار سه مرتبه در بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند.

تهیه محیط کشت و کشت ریزنمونه‌ها

پس از مرحله شستشو، پیازها در داخل پتری دیش روی کاغذ صافی استریل‌شده، قرار گرفتند. فلس‌های خارجی پیازها که در مواجهه با ماده گندزدا آسیب دیده بودند جدا و پیازها با استفاده از اسکالپل به‌صورت شعاعی به ۱۲ قطعه مساوی برش داده شدند، به‌طوری که هر قطعه دارای بخش صفحه پایگاهی باشد.

رابطه با محیط کشت بهینه برای ریزازدیادی این گیاه زینتی، بررسی ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی، به‌منظور گزینش بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشدی ضروری به‌نظر می‌رسد. در این راستا پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر نوع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین بر میزان تکثیر ریزنمونه‌های فلسی گیاه آماریلیس انجام شد تا پروتکلی کاربردی برای تکثیر این گیاه زینتی ارائه شود و از این طریق بتوان از واردات پیاز این گیاه زینتی به کشور جلوگیری کرد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

مواد آزمایشی این پژوهش، پیازهای سه‌ساله آماریلیس با قطر تقریبی ۵-۷ سانتی متر و طول تقریبی ۵-۷ سانتی متر بودند که در پایان فصل تابستان پس از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه، از گلخانه‌ای در شهرستان کاشمر جمع‌آوری و در انبار خشک و خنک با دمای ۱۰ - ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قابل ذکر است که پیازهای *Hippeastrum × johnsonii* گونه‌ای هیبرید بوده که از تلاقی *Hippeastrum reginae × Hippeastrum vittatum* حاصل شده است. پیازهای انبار شده در اواخر پاییز در گلخانه پژوهشی گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد با شرایط محیطی و تغذیه مناسب کشت و نگهداری شدند. به‌منظور حفظ و نگهداری آنها شرایط زیر فراهم شد.

- انتقال پیازهای آماریلیس به بسترکشت حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۲؛

- تأمین آهن مورد نیاز گیاه به‌صورت محلول‌پاشی روی برگ‌ها به‌صورت دو روز در میان، در مراحل اولیه استقرار پیازها؛
- آبیاری با کود NPK (۲۰، ۲۰، ۲۰) به‌صورت دو هفته در میان؛
- تأمین دمای مناسب برای آماریلیس در شبانه‌روز (دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در روز و دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای شب)؛



شکل ۱. ریزنمونه‌های مختلف فلسی (به ترتیب از راست به چپ: فلس تکی فاقد صفحه پایگاهی، فلس تکی حاوی صفحه پایگاهی و فلس جفتی حاوی صفحه پایگاهی)

گیاهچه، تعداد برگ، طول و تعداد ریشه، تعداد و قطر پیازچه باززایی شده، ارزیابی شد. در کل دوره آزمایش، شرایط نوری و دمایی برای تمامی تیمارها یکسان در نظر گرفته شده بود. این آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل (۳×۲×۴) با سه عامل شامل نوع ریزنمونه (سه سطح)، نوع تنظیم کننده رشد سیتوکنین (دو سطح) و غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین (چهار سطح) با چهار تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

آماده سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار ۸ Jump انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

اثر نوع تنظیم کننده رشد سیتوکنین بر صفات مورد ارزیابی نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که نوع تنظیم کننده رشد سیتوکنین تأثیر معنی داری بر تعداد پیازچه باززا شده داشت ($p \leq 0.05$) (جدول ۱). در محیط کشت حاوی BA، تعداد پیازچه بیشتری در مقایسه با محیط کشت حاوی TDZ باززا شد. علاوه بر تعداد پیازچه باززا شده، تعداد و طول ریشه تولید شده نیز تحت تأثیر نوع تنظیم کننده رشد سیتوکنین قرار گرفت، بدین صورت که ریزنمونه‌های رشد یافته در محیط

سپس به منظور بررسی اثر ریزنمونه، قطعات برش خورده به فلس‌های جفتی و فلس‌های تکی تقسیم شدند. همچنین فلس‌ها قبل از کشت به دو قسمت بالایی (Distal) و پایینی (Basal) تقسیم شدند، به طوری که قطعه بالایی فاقد صفحه پایگاهی و قطعه پایینی حاوی صفحه پایگاهی بود. بدین ترتیب نمونه‌های فلسی به دست آمده شامل فلس جفتی همراه با صفحه پایگاهی، فلس تکی همراه با صفحه پایگاهی و فلس تکی بدون صفحه پایگاهی بودند (شکل ۱). پس از این مرحله ریزنمونه‌ها با استفاده از یک پنس استریل در روی محیط کشت‌های مورد نظر با آرایش افقی منتقل شدند. از محیط کشت پایه MS تکمیل شده با تنظیم کننده‌های رشد BA و یا TDZ هریک شامل چهار سطح (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA استفاده شد. همچنین در محیط کشت یاد شده ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به عنوان منبع کربوهیدرات و هشت گرم در لیتر آگار برای جامد کردن محیط کشت به کار برده شد. قبل از افزودن آگار، pH محیط کشت در ۵/۷ تنظیم شد و سپس محیط کشت‌ها در ویال‌هایی (با حجم ۱۵۰ میلی لیتر و ارتفاع ۱۰ سانتی متر) به میزان ۱۵ میلی لیتر توزیع و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵۰۰-۳۰۰۰ لوکس) در دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد منتقل شدند. پس از گذشت چهار هفته، واکنش ریزنمونه‌ها در محیط کشت جدید انجام شد و در پایان واکنش دوم صفات مختلف از جمله ارتفاع

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر نوع و غلظت هورمون سیتوکین (BA و TDZ) و نوع ریزنمونه بر صفات مورد ارزیابی (میانگین مربعات)

منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد پیازچه بازآ شده	قطر پیازچه بازآ شده	تعداد برگ تولید شده	ارتفاع گیاهچه بازآ شده	تعداد ریشه تولید شده	تولید شده طول ریشه
نوع هورمون	۱	۰/۳۳۸ [*]	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۳۵۰ ^{ns}	۰/۰۰۵ ^{ns}	۲/۳۴۳ ^{**}	۸/۰۲۱ ^{**}
غلظت هورمون	۳	۰/۶۷۱ ^{**}	۰/۱۸۳ ^{**}	۰/۲۶۶ ^{ns}	۱/۹۳۷ ^{**}	۲۸/۱۴ ^{**}	۲/۸۰۳ ^{**}
نوع ریزنمونه	۲	۱۵/۵۷ ^{**}	۷/۷۹۹ ^{**}	۱۱۸/۲۶ ^{**}	۱۱۹/۶۳ ^{**}	۳۵۵/۵۳ ^{**}	۱۷۲/۳۸ ^{**}
نوع هورمون × غلظت هورمون	۳	۰/۲۰۰ [*]	۰/۰۰۹ [*]	۰/۱۷۴ ^{ns}	۰/۰۱۰ ^{ns}	۰/۳۹۳ ^{ns}	۱/۲۳۴ ^{ns}
غلظت هورمون × نوع ریزنمونه	۶	۰/۱۶۹ [*]	۰/۰۵۹ ^{**}	۰/۰۷۷ ^{ns}	۰/۵۱۷ ^{**}	۷/۲۰۴ ^{**}	۰/۹۸۸ ^{ns}
نوع هورمون × نوع ریزنمونه	۲	۰/۱۰۷ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۹۸ ^{ns}	۰/۰۱۴ ^{ns}	۰/۵۹۳ ^{ns}	۲/۰۱۳ ^{ns}
نوع هورمون × غلظت هورمون × نوع ریزنمونه	۶	۰/۰۶۹ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۷۶ ^{ns}	۰/۰۱۴ ^{ns}	۰/۱۰۰ ^{ns}	۰/۳۱۸ ^{ns}
خطا	۷۲	۰/۰۶۲	۰/۰۰۳	۰/۲۲۹	۰/۰۶۲	۰/۲۲۴	۰/۷۱۶

* و ** به ترتیب نشانگر معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۲. اثر نوع تنظیم کننده رشد سیتوکنین بر صفات مورد ارزیابی در کشت درون شیشه ای آماریلیس

نوع تنظیم کننده رشد	تعداد پیازچه باززا شده به ازای هر ریز نمونه	تعداد ریشه تولید شده	طول ریشه تولید شده (cm)
تید بازورون TDZ	۰/۷۵ ^b	۴/۰۰ ^a	۲/۹۷ ^a
بنزیل آدنین BA	۰/۸۶ ^a	۳/۶۹ ^b	۲/۳۹ ^b

میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند.

تنظیم کننده رشد سیتوکنین، تعداد پیازچه بیشتری باززا می شود ولی از قطر آنها نیز کاسته می شود. نتایج حاصل از اندازه گیری ارتفاع گیاهچه های باززا شده نشان داد که با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین، ارتفاع گیاهچه باززا شده کاهش یافت. بیشترین ارتفاع گیاهچه باززا شده در محیط کشت فاقد تنظیم کننده رشد مشاهده شد، با این حال بین این محیط کشت و محیط کشت حاوی ۵/۰ میلی گرم در لیتر تنظیم کننده رشد سیتوکنین تفاوت معنی داری از این لحاظ مشاهده نشد ($p \leq 0.05$). در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر تنظیم کننده رشد سیتوکنین، کمترین ارتفاع گیاهچه باززا به دست آمد (جدول ۳).

نتایج تجزیه واریانس داده ها بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین سطوح مختلف تنظیم کننده رشد سیتوکنین از لحاظ تعداد و طول ریشه تولیدی بود ($p \leq 0.01$) (جدول ۱). همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می شود، ریز نمونه های رشد یافته در محیط کشت فاقد تنظیم کننده رشد سیتوکنین، تعداد ریشه های بیشتر و طول تری تولید کردند که تفاوت معنی داری با سایر غلظت های تنظیم کننده رشد سیتوکنین داشت. با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین، تعداد و طول ریشه های تولید شده کاهش یافت.

پژوهش های انجام شده روی گیاهان مختلف خانواده آماریلیداسه از جمله آماریلیس و سیرتانتوس (*Cyrtanthus*)، بیانگر تأثیر مثبت افزایش غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین تا سطح مشخصی، بر تعداد و وزن پیازچه باززا شده است، ولی کاربرد غلظت های بسیار بالا نظیر ۸ و ۱۰ میلی گرم در لیتر، تأثیر منفی بر پارامترهای رشدی دارد (۱۵ و ۴۰). کاپور و همکاران (۲۰) نیز عنوان کردند افزایش غلظت تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین از صفر به دو میلی گرم در لیتر منجر به افزایش تعداد پیازچه های

کشت حاوی تنظیم کننده رشد TDZ، در مقایسه با محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد BA، تعداد ریشه بیشتر و طول تری را تولید کردند (جدول ۲).

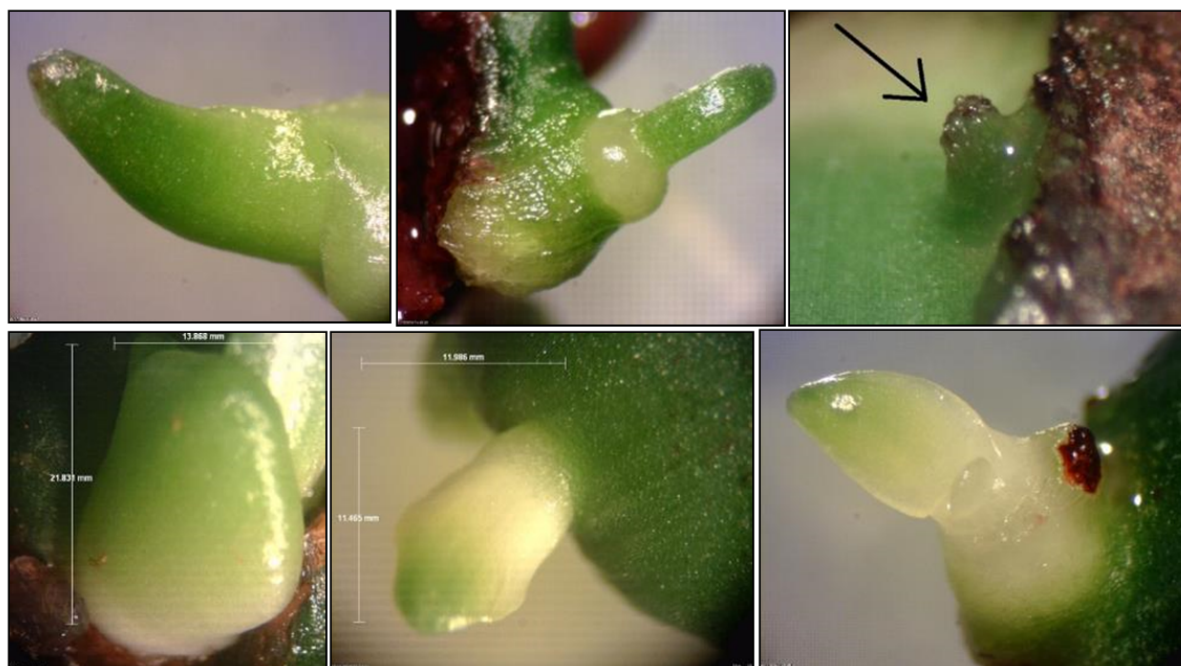
در مطالعه نات و همکاران (۲۹) که روی تکثیر درون شیشه ای گیاه لیلیوم (*Lilium longiflorum*) انجام شد، مشخص شد که تنظیم کننده های رشد TDZ و BA تأثیر متفاوتی بر میزان باززایی فلس های گیاه لیلیوم دارند. همچنین کاربرد محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد TDZ در مقایسه با محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد BA، منجر به تولید ریشه های طولی تری شد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

اثر غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین بر صفات مورد ارزیابی علاوه بر نوع تنظیم کننده رشد سیتوکنین، غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین نیز بر تعداد پیازچه باززا شده تأثیر گذار بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین، تعداد پیازچه باززا شده نیز افزایش یافت، به طوری که تعداد پیازچه باززا شده در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر تنظیم کننده رشد سیتوکنین به میزان ۱/۵ برابر بیش از این میزان در محیط کشت فاقد تنظیم کننده رشد سیتوکنین بود. قطر پیازچه باززا شده نیز تحت تأثیر غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین قرار گرفت. پیازچه های تولید شده در محیط کشت فاقد تنظیم کننده رشد سیتوکنین، در مقایسه با محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد سیتوکنین قطورتر بودند و با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین از ۵/۰ به ۲ میلی گرم در لیتر، قطر پیازچه های تولید شده کاهش یافت. چنین به نظر می رسد که یک رابطه همبستگی منفی بین صفات قطر و تعداد پیازچه باززا شده وجود دارد، بدین صورت که با افزایش غلظت

جدول ۳. اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین بر صفات مورد ارزیابی در کشت درون‌شیشه‌ای آماریلیس

غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین (mg/l)	تعداد پیازچه باززا شده	قطر پیازچه تولید شده (cm)	ارتفاع گیاهچه باززا شده (cm)	تعداد ریشه تولید شده	طول ریشه تولید شده (cm)
۰	۰/۶۷ ^c	۰/۶۸ ^a	۲/۵۲ ^a	۵/۲۱ ^a	۳/۱۴ ^a
۰/۵	۰/۶۸ ^c	۰/۶۰ ^b	۲/۴۱ ^a	۴/۱۳ ^b	۲/۶۷ ^b
۱	۰/۸۵ ^b	۰/۵۳ ^c	۲/۱۱ ^b	۳/۳۵ ^c	۲/۵۹ ^c
۲	۱/۰۲ ^a	۰/۴۷ ^d	۱/۸۹ ^c	۲/۶۹ ^d	۲/۳۲ ^d

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

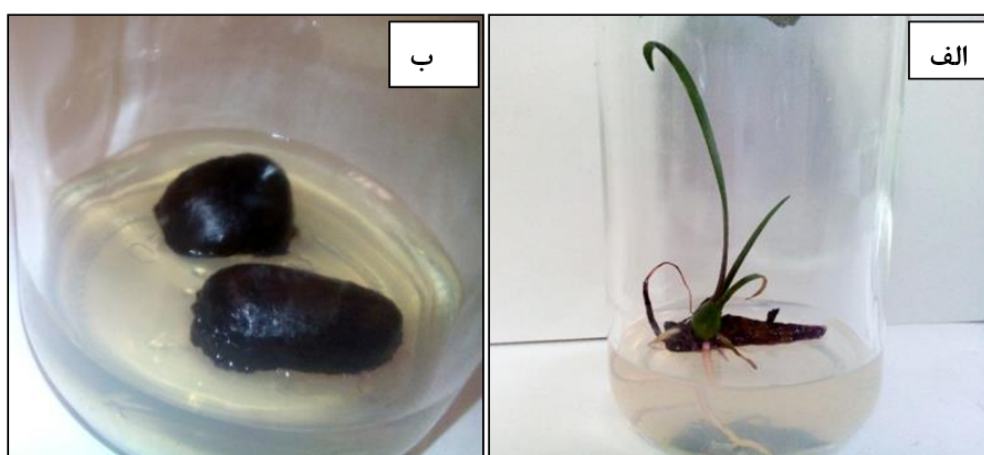


شکل ۲. مراحل اولیه تشکیل پیازچه از محل اتصال فلس به صفحه پایگاهی

اثر نوع ریزنمونه بر صفات مورد ارزیابی

نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که بین ریزنمونه‌های مختلف، از نظر تعداد و قطر پیازچه باززا شده تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p \leq 0.01$) (جدول ۱). بررسی روزانه ریزنمونه‌های کشت شده نشان داد که علائم باززایی مستقیم روی ریزنمونه‌های حاوی صفحه پایگاهی پس از گذشت یک هفته مشاهده شد (شکل ۲). در صورتی که طی واکشت‌های متعدد، ریزنمونه‌های فلس تکی فاقد صفحه پایگاهی پاسخ رشدی مناسبی را از خود نشان ندادند و به مرور زمان، در طی واکشت‌های متعدد، قهوه‌ای رنگ شدند و پتانسیل باززایی خود

باززا شده در ریزنمونه‌های فلسی گیاه لیلیوم شد. در پژوهش حاضر نیز بیشترین تعداد پیازچه باززا شده در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین مشاهده شد. نتایج پژوهش آلریچ و همکاران (۴۲) روی تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه کرینیوم (Crinum)، از خانواده آماریلیداسه نشان داد که افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین باعث کاهش ارتفاع گیاهچه‌های باززا شده شد که با نتایج این پژوهش مطابق است. همچنین نتایج پژوهش‌ها روی گیاه لیلیوم بیانگر تأثیر منفی افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین بر تعداد و وزن ریشه تولیدی است (۴).



شکل ۳. مقایسه تأثیر حضور و عدم حضور صفحه پایگاهی بر میزان باززایی ریزنمونه فلس تکی. الف) فلس تکی همراه با صفحه پایگاهی و ب) فلس تکی بدون صفحه پایگاهی

جدول ۴. اثر نوع ریزنمونه بر صفات مورد ارزیابی در کشت درون شیشه‌ای آماریلیس

نوع ریزنمونه	تعداد پیازچه باززا شده	قطر پیازچه تولید شده (cm)	تعداد برگ تولید شده	ارتفاع گیاهچه باززا شده (cm)	تعداد ریشه تولید شده	طول ریشه تولید شده (cm)
فلس تکی	۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ^c	۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ^b	۰/۰۰ ^b
فلس تکی با صفحه پایگاهی	۱/۱۹ ^a	۰/۸۱ ^b	۳/۲۲ ^a	۳/۳۱ ^a	۵/۵۹ ^a	۳/۹۸ ^a
فلس جفتی با صفحه پایگاهی	۱/۲۳ ^a	۰/۸۹ ^a	۳/۴۳ ^a	۳/۳۸ ^a	۵/۹۴ ^a	۴/۰۶ ^a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

ریزنمونه فلس جفتی با صفحه پایگاهی مشاهده شد. با این حال بین ریزنمونه‌های فلس جفتی و فلس تکی با صفحه پایگاهی، تفاوت معنی‌داری از نظر این صفات مشاهده نشد ($p \leq 0.05$). شایان ذکر است که در این دو نوع ریزنمونه ابتدا پیازچه‌ها به‌طور مستقیم از محل اتصال فلس به صفحه پایگاهی باززا شدند و سپس برگ‌ها حول محور پیازچه‌ها تشکیل شدند. مقایسه تعداد و طول ریشه تولیدی در ریزنمونه‌های مختلف، بیانگر تفاوت معنی‌دار بین انواع مختلف ریزنمونه‌ها بود ($p \leq 0.01$). ریزنمونه‌های فلس تکی به مرور زمان قهوه‌ای رنگ شدند و هیچ‌گونه ریشه‌ای تولید نکردند و تفاوت معنی‌داری از نظر تعداد و طول ریشه تولیدی، با سایر ریزنمونه‌ها داشتند. ریزنمونه‌های فلس جفتی با صفحه پایگاهی بیشترین تعداد و

را به‌صورت ۱۰۰ درصد از دست دادند (شکل ۳). بیشترین تعداد پیازچه باززا شده در ریزنمونه فلس جفتی با صفحه پایگاهی مشاهده شد، ولی تفاوت معنی‌داری از این لحاظ با فلس تکی با صفحه پایگاهی نداشت ($p \leq 0.05$). همچنین میانگین قطر پیازچه‌های تولید شده از ریزنمونه‌های فلس جفتی با صفحه پایگاهی نسبت به ریزنمونه‌های فلس تکی با صفحه پایگاهی بیشتر بود (جدول ۴).

تعداد برگ تولید شده و همچنین ارتفاع گیاهچه باززا شده نیز تحت تأثیر نوع ریزنمونه قرار گرفت. در ریزنمونه‌های فلس تکی به‌علت عدم باززایی، هیچ‌گونه برگ‌ی نیز تولید نشد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان رشد پیازچه‌های باززا شده نشان داد که بیشترین تعداد برگ تولیدی و ارتفاع گیاهچه باززا شده در

طول‌ترین ریشه‌ها را تولید کردند (جدول ۴).

در خانواده نرگس‌سانان، عموماً از ریزنمونه فلس جفتی برای پرآوری در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده می‌شود (۱۱). در بسیاری از گیاهان پیازی، پیازچه‌های جدید از محل اتصال فلس‌ها به صفحه پایگاهی ایجاد می‌شوند (۱۱ و ۱۳). در بیشتر موارد، پیازچه‌ها در بین دو لایه صفحه پایگاهی تشکیل می‌شوند (۳۲).

فلورز (۱۲) بیان کرد ریزنمونه فلس جفتی، ریزنمونه مناسبی برای تکثیر آماریلیس در شرایط درون‌شیشه‌ای است. پیریک و ایپل (۳۱) خاطر نشان کردند که برای تشکیل پیازچه از ریزنمونه‌های فلسی گیاه نرین (Nerine)، از خانواده آماریلیداسه، حضور بخشی از صفحه پایگاهی ضروری است. در آزمایشی که توسط امانی و همکاران (۳) روی گیاه آماریلیس صورت گرفت، مشخص شد که ریزنمونه‌های تک فلسی فاقد صفحه پایگاهی، تنها زمانی علائم باززایی را از خود نشان می‌دهند که از نزدیک‌ترین ناحیه به صفحه پایگاهی تهیه شده باشند و با افزایش فاصله از صفحه پایگاهی، درصد تولید پیازچه کاهش و در نهایت به صفر می‌رسد. همچنین مطالعات فنل و ون استادن (۱۱) نشان داد که در خانواده آماریلیداسه، حضور صفحه پایگاهی همراه با ریزنمونه فلس ضروری است. در غیر این صورت، پیازچه‌ای تشکیل نخواهد شد. در پژوهش حاضر نیز هیچ‌گونه علائم باززایی از ریزنمونه‌های فلس تکی فاقد صفحه پایگاهی مشاهده نشد.

کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد مشاهده شد. همچنین تفاوت چشمگیری از لحاظ تعداد پیازچه باززا شده بین تنظیم‌کننده‌های رشد BA و TDZ در سطح دو میلی گرم در لیتر مشاهده شد. از سوی دیگر، با افزایش غلظت هر دو نوع تنظیم‌کننده رشد سیتوکین، قطر پیازچه باززا شده کاهش یافت. محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد، پیازچه‌های قطورتری در مقایسه با سایر تیمارها ایجاد کرد و کمترین قطر پیازچه باززا شده به سطح دو میلی گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA اختصاص داشت (شکل ۴).

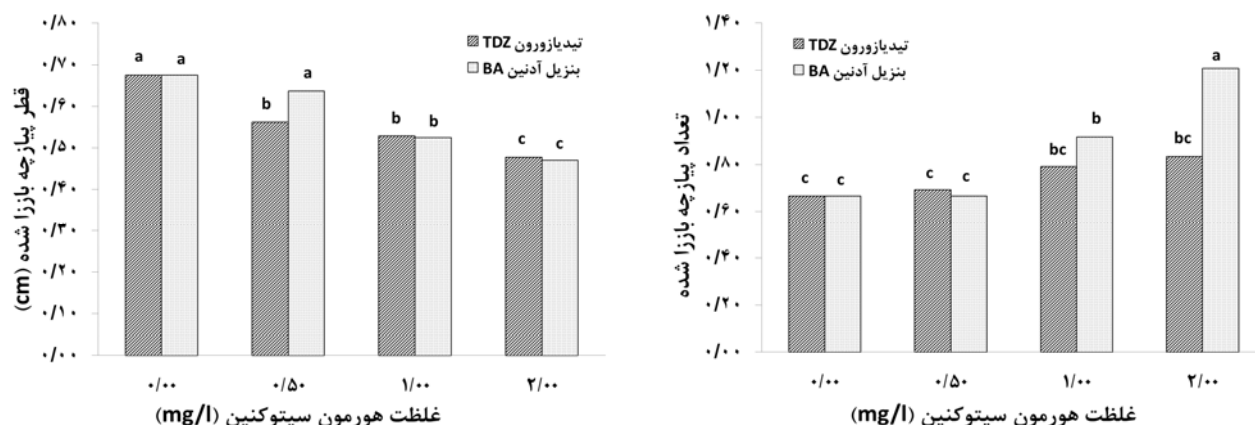
نات و همکاران (۲۹) در پژوهش خود، اثر متفاوت غلظت‌های انواع مختلف سیتوکین را بر تکثیر گیاه لیلیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای گزارش کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA، در مقایسه با سایر ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی، پیازچه‌های قطورتری را تولید کردند و افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد BA از ۰/۲ به ۱ میلی گرم در لیتر منجر به کاهش قطر پیازچه باززا شده شد که با نتایج پژوهش حاضر در رابطه با کاهش قطر پیازچه مطابقت دارد. در مطالعه دیگری که روی تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه نرین (از خانواده آماریلیداسه) انجام شد، مشخص شد که بیشترین تعداد پیازچه باززا شده در هر ریزنمونه، در محیط کشت MS حاوی دو میلی گرم در لیتر BA و یک میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد (۲۳).

اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکین بر تعداد و قطر پیازچه باززا شده آماریلیس

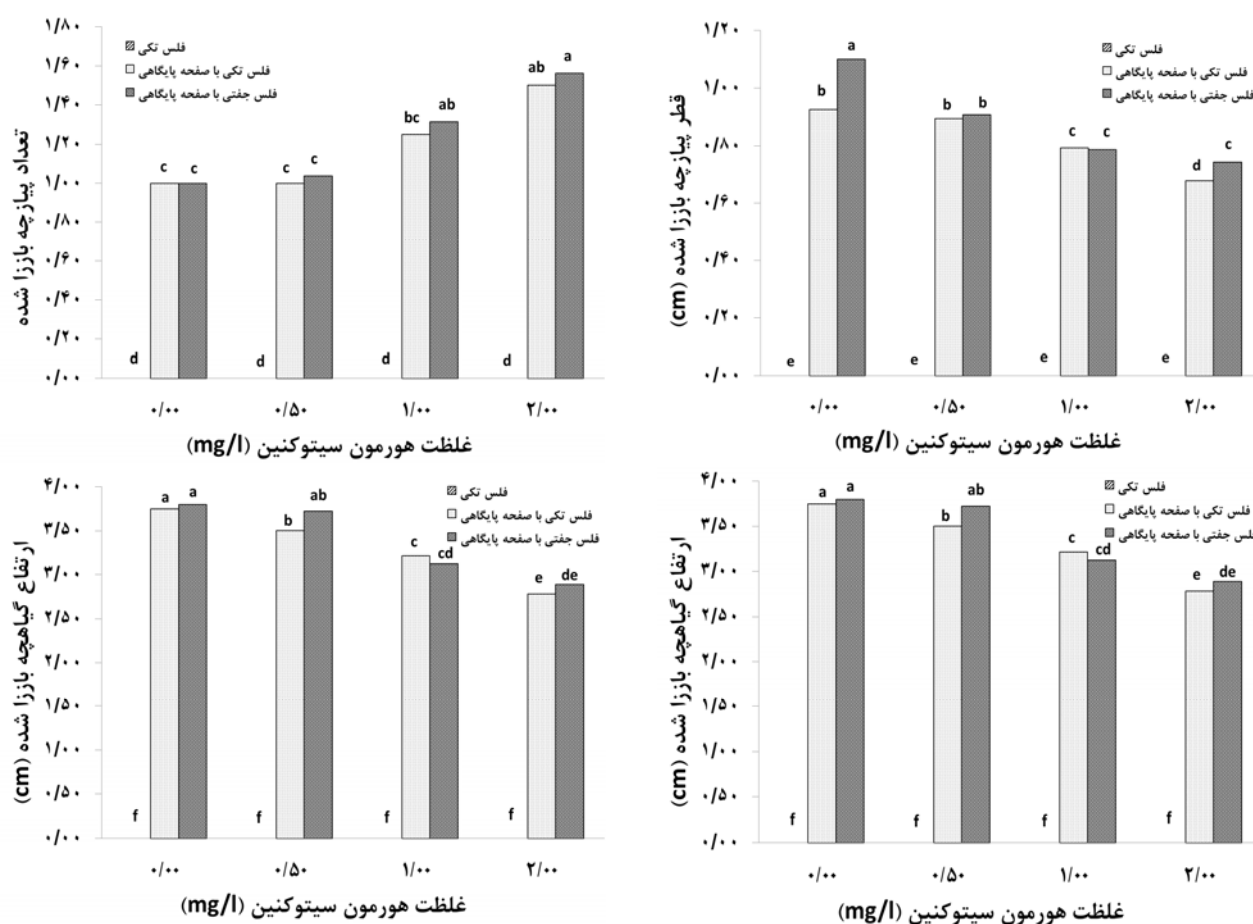
نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکین تأثیر معنی‌داری بر تعداد و قطر پیازچه‌های باززا شده داشتند ($p \leq 0/05$) (جدول ۱). با افزایش غلظت هر دو نوع تنظیم‌کننده رشد سیتوکین تعداد پیازچه باززا شده افزایش یافت. شمارش تعداد پیازچه باززا شده نشان داد که در محیط کشت حاوی دو میلی گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA، بیشترین تعداد پیازچه باززا شد و کمترین تعداد پیازچه باززا شده نیز در محیط

اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکین بر صفات مورد ارزیابی

نتایج مندرج در شکل ۵ بیانگر تأثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایش بر تعداد و قطر پیازچه باززا شده بود ($p \leq 0/05$). در تمامی سطوح مورد بررسی، ریزنمونه‌های فلس جفتی با صفحه پایگاهی، تعداد پیازچه بیشتری را در مقایسه با ریزنمونه‌های فلس تکی با صفحه پایگاهی تولید کردند، ولی با این حال در سطوح مختلف مورد بررسی، بین این دو نوع ریزنمونه از لحاظ تعداد پیازچه باززا شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.



شکل ۴. اثر متقابل نوع و غلظت تنظیم کننده رشد سیتوکنین بر تعداد و قطر پیازچه باززا شده آماریلِس. میانگین های دارای حروف مشابه در هر شکل، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند.



($p \leq 0/05$). همچنین نتایج نشان داد که غلظت‌های متفاوت سیتوکنین تأثیری بر باززایی ریزنمونه‌های فلس تکی نداشتند و در این نوع ریزنمونه‌ها هیچ‌گونه پیازچه‌ای باززا نشد و به‌مرور زمان، ریزنمونه‌ها قهوه‌ای‌رنگ شدند. نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر پیازچه‌های باززا شده نشان داد که قطورترین پیازچه‌ها در ریزنمونه‌های فلس جفتی با صفحه پایگاهی و در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد حاصل شدند. همچنین در این نوع محیط کشت تفاوت معنی‌داری بین انواع مختلف ریزنمونه مشاهده شد و کاربرد ریزنمونه فلس جفتی با صفحه پایگاهی منجر به افزایش ۱۸ درصدی قطر پیازچه‌ها در مقایسه با ریزنمونه‌های فلس تکی با صفحه پایگاهی شد (شکل ۵).

همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، کشت ریزنمونه‌های فلس جفتی با صفحه پایگاهی در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد منجر به تولید گیاهچه‌های طویل‌تری در مقایسه با سایر تیمارها شد. همچنین در هر دو نوع ریزنمونه باززا شده، افزایش سطوح تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین باعث کاهش ارتفاع گیاهچه‌های تولیدی شد. مقایسه تعداد ریشه تولید شده در تیمارهای مختلف بیانگر تأثیر معنی‌دار نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین بر این صفت بود ($p \leq 0/01$). افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین تأثیر منفی بر تعداد ریشه تولید شده داشت، به‌طوری که بیشترین تعداد ریشه تولید شده، در ریزنمونه فلس جفتی با صفحه پایگاهی و محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد حاصل شد. در ریزنمونه‌های فلس تکی، به‌علت عدم باززایی، هیچ‌گونه علائم ریشه‌زایی در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین مشاهده نشد (شکل ۵).

در بررسی ریزنمونه‌های فلس تکی گیاه آماریلیس در شرایط درون‌شیشه‌ای مشخص شد که باززایی پیازچه از ریزنمونه‌های فلس تکی دارای صفحه پایگاهی، در غیاب تنظیم‌کننده‌های رشد نیز اتفاق افتاد، درحالی که ریزنمونه‌های فلس تکی بدون صفحه پایگاهی، تنها در حضور تنظیم‌کننده رشد BA موفق به القای پیازچه شدند. ریزنمونه‌های فلس تکی دارای صفحه پایگاهی، به‌میزان ۱۰۰ درصد باززایی از خود

نشان دادند، درحالی که در ریزنمونه‌های فلس تکی بدون صفحه پایگاهی، بیشترین باززایی (۷۵ درصد) هنگامی به‌دست آمد که از قسمت پایه‌ای فلس برش داده شدند و باززایی صفر و یا بسیار اندکی در ریزنمونه‌های برگرفته از قسمت انتهایی فلس مشاهده شد. بیشترین تعداد پیازچه از ریزنمونه‌های فلس تکی با صفحه پایگاهی و در حضور یک میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد (۳). مطالعه انجام شده توسط یاناگاوا و اوساکی (۴۵) روی گیاه آماریلیس نشان داد که ریزنمونه‌های تک‌فلسی حاوی صفحه پایگاهی، در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد درصد بالایی از باززایی را از خود نشان دادند و از این لحاظ تفاوت معنی‌داری با محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد نداشتند. همچنین نتایج پژوهش آنها نشان داد که کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در ریزنمونه‌های تک‌فلسی تهیه شده از بخش بالایی پیاز (۲۰ میلی‌متر بالاتر از صفحه پایگاهی)، هیچ‌گونه تأثیری بر میزان باززایی آنها نداشت و پیازچه‌ای از این نوع ریزنمونه‌ها تشکیل نشد. در پژوهش حاضر نیز ریزنمونه‌های تک‌فلسی فاقد صفحه پایگاهی از قسمت بالایی پیاز تهیه شده بودند و کاربرد غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین هیچ‌گونه تأثیری بر باززایی آنها نداشت.

نتایج مطالعات فلورز (۱۲) نشان داد برای القای تولید پیازچه از ریزنمونه‌های فلس جفتی آماریلیس، کاربرد محیط کشت حاوی چهار میکرومولار (۹۰/۰ میلی‌گرم در لیتر) BA و یک میکرومولار (۱۸/۰ میلی‌گرم در لیتر) NAA مناسب است. در پژوهش دیگری اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد BA بر باززایی ریزنمونه‌های فلس تکی و جفتی آماریلیس بررسی شد. بیشترین تعداد پیازچه از ریزنمونه‌های فلس جفتی و در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA حاصل شد (۲). با این حال نتایج مطالعات انجام شده روی تکثیر ریزنمونه‌های فلس جفتی پیاز برانسویجیا آندولاتا (*Brunsvigia undulata*)، از خانواده آماریلیداسه نشان داد که کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی پیازچه از ریزنمونه‌های فلس جفتی ضروری نیست (۳۲). در رابطه با گیاه گالاتوس



شکل ۶. گیاهچه‌های سازگار شده آماریلیس در شرایط گلخانه

حال مجیب و همکاران (۲۸) برای ریشه‌زایی گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای آماریلیس از محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد IBA استفاده کردند. سهولت در ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی آماریلیس، نیز توسط امانی و همکاران (۲) گزارش شده است. در پژوهش آنها از ریزنمونه‌ها و ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی مختلفی استفاده شد و در تمامی تیمارها ریشه‌زایی به‌خوبی صورت گرفت. آنها عنوان کردند چنانچه هدف تنها ریشه‌زایی نمونه‌های کشت بافتی باشد، کاربرد محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد نتیجه مطلوبی را در پی خواهد داشت. در بین انواع مختلف ریزنمونه مورد استفاده، ریزنمونه‌هایی که دارای صفحه پایگاهی بودند (فلس جفتی و فلس تکی) در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها از ریشه‌زایی بهتری برخوردار بودند. در پژوهش حاضر نیز ریزنمونه‌های فلس جفتی همراه با صفحه پایگاهی، در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین تعداد ریشه بیشتری را تولید کردند. در پایان آزمایش گیاهچه‌های ریشه‌دار آماریلیس به گلدان‌های حاوی مخلوطی از کوکوپیت: پرلیت به نسبت ۱:۲ منتقل شدند و مراحل سازگاری در شرایط محیطی 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با میزان موفقیت ۹۸ درصد صورت گرفت و سپس گیاهان سازگار شده به شرایط گلخانه انتقال یافتند (شکل ۶).

(*Galanthus*)، از خانواده آماریلیداسه، تشکیل پیازچه‌های جدید از ریزنمونه‌های فلس جفتی، در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد نیز گزارش شده است (۳۸). نتایج پژوهش ویتومسکا و همکاران (۴۳) نشان داد که باززایی ریزنمونه‌های فلس جفتی آماریلیس، در شرایط عدم حضور تنظیم‌کننده‌های رشدی نیز اتفاق افتاد و تعداد پیازچه باززا شده در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد نسبت به سایر تیمارها، در بیشتر موارد بالاتر بود.

در رابطه با بسیاری از جنس‌های خانواده آماریلیداسه تشکیل پیازچه از ریزنمونه‌های فلس جفتی در غیاب تنظیم‌کننده‌های رشدی نیز می‌تواند اتفاق افتد. جنس‌هایی مانند پانکراتیوم مریم‌ارپیوم (*Pancratium maritimum* L.) (۸)؛ نرگس (*Narcissus tazetta* L.) (۳۹)؛ آماریلیس (*Amaryllis belladonna* L.) (۷)؛ سیرتانتوم (*Cyrtanthus elatus* (Jacq.) Traub) (۲۲)؛ کرینیوم (*Crinum macowanii* Baker.) (۳۷) و نرین (*Nerine bowdenii* Watson.) (۲۷). درصد بالای تولید پیازچه در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد نشان می‌دهد که میزان تنظیم‌کننده رشدی داخلی ریزنمونه‌های فلس جفتی به حد کافی بالا است که می‌تواند باعث القای تولید پیازچه شود (۲۴). سیروک و کومینگ (۳۴) گزارش کردند که در مرحله تکثیر آماریلیس، ریشه‌زایی نیز به‌خوبی صورت می‌گیرد و نیازی به استفاده از محیط کشت ریشه‌زایی نیست. با این

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ریزنمونه‌های فلس جفتی همراه با صفحه پایگاهی در مقایسه با سایر ریزنمونه‌های مورد استفاده، ریزنمونه‌های مناسب‌تری برای تکثیر گیاه آماریلیس در شرایط درون‌شیشه‌ای هستند و پیازچه‌های قطورتری را تولید می‌کنند. از سوی دیگر، در ریزنمونه‌های فلس تکی هیچ‌گونه پیازچه‌ای باززا نشد و به مرور زمان، ریزنمونه‌ها قهوه‌ای رنگ شدند. همچنین نوع تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین (BA و TDZ) تأثیر معنی‌داری بر قطر پیازچه باززا شده نداشت ولی در محیط

کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد BA، تعداد پیازچه بیشتری در مقایسه با محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد TDZ باززا شدند. به‌طور کلی، یک رابطه همبستگی منفی بین صفات قطر و تعداد پیازچه باززا شده مشاهده شد، بدین صورت که با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد سیتوکنین، تعداد پیازچه باززا شده افزایش یافت ولی از قطر آنها نیز کاسته شد. محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد پیازچه‌های کمتر و قطورتری در مقایسه با سایر تیمارها ایجاد کرد.

منابع مورد استفاده

1. Alkema, H.Y. 1975. Vegetative propagation of daffodils by double-scaling. *Acta Horticulture* 47: 193-199.
2. Amani, S., H. Zarei, A. M. Azar and K. Mashayekhi. 2015. Micropropagation of hippeastrum hybridum. *Cumhuriyet Science Journal* 36(4): 594-605.
3. Amani, Sh., H. Zarei, S. Alizadeh Ejirloo and K. Kambiz Mashayekhi. 2011. Bulblet regeneration from single and twin scale of amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) during in vitro culture. In: Proceeding of the First National Congress of Science and Technology in Agriculture, Zanjan, Zanjan University (in Farsi).
4. Asker, H. M. 2015. Inflorescence bulbils of tiger lily in vivo and bulbils culture in vitro. *African Journal of Biotechnology* 14(35): 2616-2621.
5. Aslam, F., S. Habib S. and Naz. 2012. Effect of different phytohormones on plant regeneration of Amaryllis hippeastrum. *Pakistan Journal of Science* 64: 54-60.
6. De Bruyn, M.H. 1997. Micropropagation of amaryllis (*Hippeastrum × hybridum*). In: Bajaj, Y. P. S. Biotechnology in Agriculture and Forestry 40, High-Tech and Micropropagation VI. Springer Verlag, Heidelberg, New York.
7. De Bruyn, M. H., D. I. Ferreira, M. M. Slabbert and J. Pretorius. 1992. In vitro propagation of Amaryllis belladonna. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31(3): 179-184.
8. Dragassaki, M., A. S. Economou and J. C. Vlahos. 2001. Bulblet formation in vitro and plantlet survival extra vitrum in *Pancratium maritimum* L. In: Proceeding of the I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants, Sani-Halkidiki, Macedonia, Greece. pp: 616: 347-352.
9. El-Shamy, H. A. 2005. Effect of growth regulators and photoperiod on micropropagation of Amaryllis (*Hippeastrum vittatum*). In: Proceeding of the Sixth Arabian Horticulture Conference, Ismailia, Egypt. pp: 183-197.
10. Ephrath, J. E., J. Ben-Asher, F. Baruchin, C. Alekperov, E. Dayan and M. Silberbush. 2001. Various cutting methods for the propagation of hippeastrum bulbs. *Biotronics* 30: 75-83.
11. Fennell, C. W., J. Van Staden and C. H. Bornman. 2004. Biotechnology of southern African bulbs. *South African Journal of Botany* 70(1): 37-46.
12. Flores, P. S. 2003. In vitro and in vivo propagation of *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae). Patricia Silva Flores, Florianópolis.
13. Han, B. H., B. W. Yae, H. J. Yu and K. Y. Peak. 2005. Improvement of in vitro micropropagation of *Lilium oriental* hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. *Scientia Horticulturae* 103(3): 351-359.
14. Hanks, G. R. and A. R. Rees. 1979. Twin-scale propagation of narcissus: a review. *Scientia Horticulture* 10: 1-14.
15. Hong, J. and A. K. Lee. 2012. Micropropagation of *Cyrtanthus* 'Orange Gem' × *C. eucallus* hybrid. *Scientia Horticulturae* 142: 174-179.
16. Huang, C. L., K. C. Chang and H. Okubo. 2005a. In vitro morphogenesis from Pedicels of *Hippeastrum × hybridum*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 50: 27-33.
17. Huang, C. L., K. C. Chang and H. Okubo. 2005 b. In vitro morphogenesis from ovaries of *Hippeastrum × hybridum*.

- Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 50: 19-25 .
18. Huang, C. W., H. Okubo and S. Uemoto. 1990. Comparison of bulblet formation from twin scales and single scales in *Hippeastrum hybridum* cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 42: 151-160.
 19. Hussey, G. 1980. Propagation of some members of Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae by tissue culture. In: Brickell, C. D., Cutler, D. F. and Gregory, M. (Eds.). *Petaloid Monocotyledons*. In: *Proceeding of the Linnean Society Symposium Series*, Academic Press London .
 20. Kapoor, R., S. Kumar, J. K. Kanwar and P. K. Mahajan. 2008. *In vitro* bulblet productivity in different explants of hybrid lilies. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 16: 345-352.
 21. Khalighi, A. 2005. *Floriculture, Propagation the Ornamental Plants of Iran*. Ninth Edition, Ruzbehan Publications, Tehran. (in Farsi).
 22. Kukulczanka, K. and K. Kromer. 1987. Propagation of *Vallota purpurea* Herb. through tissue culture. *International Symposium on Propagation of Ornamental Plants* 226: 129-136.
 23. Lee, S.Y ., J. H. Ahn and Y. J. Park. 2004. Effects of growth regulators and sucrose concentrations on the bulblet formation through *in vitro* culture of scale segment in *Nerine bowdenii*. *Journal of Plant Biotechnology* 31(2): 139-143.
 24. Maesato, K., K. Sharada, H. Fukui, T. Hara and K. S. Sarma. 1994. *In vitro* bulblet regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thunb. Effect of plant growth regulators and culture environment. *Journal of Horticultural Science* 69(2): 289-297.
 25. Mii, M., T. Mori and N. Iwase. 1974. Organ formation from the excised bulb scales of *Hippeastrum hybridum in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 45: 241-244.
 26. Mirzakhani, A. 2012. Coordination centre of Knowledge and industry of flowers and ornamental plants. www.uiccop.ir (In Farsi).
 27. Mochtak, E. 1988. Bulblet formation from the explants of *Nerine bowdenii* W. Wats. In: *Proceeding of the III International Symposium on Growth Regulators in Ornamental Horticulture*, Chania, Crete, Greece, pp: 251: 199-204.
 28. Mujib, A., S. Banerjee and P. Dev Ghosh. 2007. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture-raised *hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). *Propagation of Ornamental Plants* 7: 169-174.
 29. Nhut, D. T., T. D. Nguyen, Q. L. Vu, Q. T. Nguyen, T. M. Nguyen, X. D. Thai and V. L. Bui. 2006. Standardization of *in-vitro* lily (*Lilium spp.*) plantlets for propagation and bulb formation. In: *Proceedings of the International Workshop on Biotechnology in Agriculture*, Seoul, Korea, pp: 20-21.
 30. Okubo, H. 1993. *Hippeastrum* (Amaryllis). pp. 321-334. In: A. A. De Hertogh and M. Le Nard (Eds.), *The Physiology of Flower Bulbs*, Elsevier Publication, Amsterdam.
 31. Pierik, R. L. M. and B. J. Ippel. 1977. Plantlet formation from excised bulb scale segments of *Nerine*. *Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes*, Gent, Belgium, 78: 197-202.
 32. Rice, L. J., J. F. Finnie and J. Van Staden. 2011. *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal of Botany* 77(2): 305-312.
 33. Rikken, M. 2010. *The European Market for Fair and Sustainable Flowers and Plants* BTC, Belgian Development Agency.
 34. Seabrook, J. E. A. and B. G. Cumming. 1977. The *In vitro* Propagation of Amaryllis (*Hippeastrum spp.* Hybrids). *In Vitro* 13(12): 831-836.
 35. Sharifi A., N. Moshtaghi and A. R. Bagheri. 2010. *Applied Plant Tissue Culture*. First Edition, Jahad-e-Daneshgahi Publication, Mashhad. (In Farsi).
 36. Siddique, M. N. A., N. Sultana, M. A. Haque, M. M. Hossain and J. U. Ahmed. 2006. Effect of twin scale size and hormones on *in vitro* propagation of *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*). *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 16(2): 105-110.
 37. Slabbert, M. M., M. H. De Bruyn, D. I. Ferreira and J. Pretorius. 1993. Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33(2): 133-141.
 38. Staikidou, I., C. Selby and G. Hanks. 2004. Stimulation of *in vitro* bulblet growth in *Galanthus* species with sucrose and activated charcoal. In: *Proceeding of the V International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, Debrecen, Hungary. 725: 421-426.
 39. Steinitz, B. and H. Yahel. 1982. *In vitro* propagation of *Narcissus tazetta*. *HortScience* 17(3):333-334.
 40. Sultana, J., N. Sultana, M. N. A. Siddique, A. K. M. A. Islam, M. M. Hossain and T. Hossain. 2010. *In vitro* bulb production in *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*). *Journal of Central European Agriculture* 11(4): 469-474.
 41. Trinklein, D. 2009. Amaryllis: an alternative plant for the holidays. *Division of Plant Sciences* 15(12): 91.
 42. Ulrich, M. R., F. T. Davies Jr, Y. C. Koh, S. A. Duray and J. N. Egilla. 1999. Micropropagation of *Crinum Ellen Bosanquet* by tri-scales. *Scientia Horticulturae* 82(1): 95-102.

43. Witomska, M., A. Łukaszewska and M. Wojtowicz 2008. Micropropagation of *Hippeastrum* × *chmielei* chm. From scale and scape explants. *Propagation of Ornamental Plants* 8(3): 158-160.
44. Xiao-Ming, L. 2009. Study on adventitious bud induction of *Hippeastrum hybridum* bulb. *Journal of Anhui Agricultural Science* 34:16769-16770.
45. Yanagawa, T. and T. Osaki. 1996. *In vitro* Propagation of Bulblets and Elimination of Viruses by Bulb-scale Cultures of *Hippeastrum hybridum* Bulbs. *Plant Tissue Culture Letters* 13(2): 147-152 .
46. Zayed, R., H. El-Shamy, S. Berkov, J. Bastida and C. Codina. 2011. In vitro micropropagation and alkaloids of *Hippeastrum Vittatum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 47:695-701 .

Comparison of Foliar and Soil Fe Fertilization on *Medicago scutellata* Physiological-Biochemical Characteristics and Active Iron in Soils Containing Different Amounts of Lime

Z. Gheshlaghi¹, R. Khorassani^{2*}, M. Kafi³ and A. Fotovat⁴

(Received: November 5-2018; Accepted: February 27-2019)

Abstract

Reducing iron solubility in calcareous soils causes iron chlorosis symptoms in the plant. In order to investigate the response of *M. scutellata* to direct and indirect iron deficiency, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. The experimental factors included three levels of lime (0, 4 and 8%) and five levels of Fe (0, 5 and 10 mg Fe Kg soil⁻¹ as soil application and 0 and 2.1 μ M Fe as foliar spray). Zero Fe concentrations in soil and foliar Fe fertilization was considered as control-S and control-F treatment, respectively. The results showed that the amendment of 8% CaCO₃ in control treatments caused typical Fe deficiency symptoms, including decreases in chlorophyll, total and extractable leaf Fe concentration, protein, leaf relative water content, membrane stability index and increases in leaf total phenolic and flavonoid concentration when compared to 0% lime. The soil and foliar Fe fertilisation led to the improvement of Fe chlorosis, increases in chlorophyll, Fe, protein, and decreases in concentration of phenolic compounds in three levels of lime. The foliar Fe fertilization in three levels of lime increased total and extractable leaf Fe content, compared to two soil Fe treatments, but foliar Fe fertilization (in 4 and 8% of lime) yielded progressively lower leaf phenolic compounds. The highest leaf chl concentration in 8% lime was observed in 10 mg Fe Kg soil⁻¹ and foliar Fe fertilization. The presented data indicate that the use of foliar application of Fe (Fe- EDDHA) is potent to reduce the effects of lime induced chlorosis in plants in calcareous soils.

Keywords: Calcium carbonate, Chlorosis, Fe-EDDHA, Phenolic and Flavonoids Compounds

1, 2, 4. PhD Graduate, Associate Professor and Professor, Respectively, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*: Corresponding Author, Email: khorasani@um.ac.ir