

اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در باززایی مستقیم سوخچه از ریزنمونه فلسی لاله واژگون

سعید حمیداوغلی^۱، اسماعیل چمنی^۲، یوسف حمیداوغلی^{۳*} و نگار طالعی^۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۹)

چکیده

لاله واژگون (*Fritillaria imperialis*) گیاهی تک‌لپه از خانواده Liliaceae است. علاوه بر گل زیبا از ارزش دارویی بالایی نیز برخوردار است و به صورت وحشی در مناطقی از کشور ایران رشد می‌کند. به دلیل برداشت کنترل نشده گل و سوخ‌های این گیاه، بقای لاله واژگون در بسیاری مناطق ایران با تهدید روبرو شده است. این گیاه در شرایط مناسب حدود ۶ سال طول می‌کشد تا بتواند سوخی تولید کند که توانایی تشکیل گل را دارا باشد. به علاوه گیاهان حاصل از بذر به دلیل دگرگرده افشانی گونه‌های *Fritillaria* شبیه والدین نخواهند بود. افزایش انبوه لاله واژگون از طریق روش‌های مرسوم دیگر از قبیل کشت فلس از کارایی لازم برخوردار نبوده است. بنابراین با توجه به ضرورت حفظ و محافظت از آن در عرصه‌های طبیعی، ازدیاد درون شیشه‌ای این گیاه مورد توجه قرار گرفت. در این پژوهش باززایی مستقیم سوخچه از کشت فلس‌های گندزدایی شده‌ی لاله واژگون در محیط پایه موراشیگ و اسکوگ در حضور تنظیم کننده‌های رشد IAA، NAA، BA، Kinetin، TDZ به طور جداگانه و ۴ ترکیب از Kinetin و NAA مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین میزان باززایی مستقیم (۸/۳۳ عدد سوخچه)، بیشترین اندازه سوخچه (۲۶ میلی‌متر) و بالاترین تعداد ریشه (۸ عدد) در ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمدند. کمترین تولید سوخچه در تیمارهای هورمون TDZ مشاهده شد زیرا در حضور TDZ، محدود سوخچه‌های تشکیل شده به جای بزرگ شدن به سمت تولید کالوس تمایل داشتند. در تیمار BA باززایی صورت نگرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ازدیاد درون شیشه‌ای گیاه لاله واژگون، با استفاده از ۲ میلی‌گرم هورمون NAA امکان‌پذیر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لاله واژگون، ازدیاد درون شیشه‌ای، هورمون‌های رشد، فلس

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳ و ۴. به ترتیب دانشیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Hamidoghli@guilan.ac.ir

مقدمه

لاله واژگون (*Fritillaria* spp.) یکی از گیاهان موجود در خانواده Liliaceae است. این تیره شامل گیاهانی غالباً علفی، دارای پیاز و ریزوم می‌باشد (۶). لاله واژگون به دلیل زیبایی، بازارپسندی بالایی دارد و بازارهای کشورهای آمریکایی و اروپایی توجه خاصی به این گیاه نشان می‌دهند (۱). در مقیاس تجارتي تنها ۲ گونه لاله واژگون شامل *F. imperialis* و *F. meleagris* پرورش می‌یابند (۹). این گیاه از نظر دارویی نیز اهمیت فراوان دارد و آلكالوئیدها و گلیکوزیدهای متعددی در این گیاه مشخص شده است. در ایران دو گونه *F. persica* و *F. imperialis* وجود دارد که براساس سیاست‌های سازمان حفاظت محیط زیست به عنوان ذخیره ژنتیکی و عنصر زیبایی شناختی قلمداد شده و نیاز به حفاظت دارند زیرا با توجه به پراکنش محدود و متراکم، چرای دام‌ها، جاده سازی، بوته کنی، برداشت گل و پیاز، به نظر می‌رسد بقای لاله واژگون در آینده با چالش روبه‌رو گردد (۳).

لاله واژگون را می‌توان از طریق کاشت بذر و روش‌هایی از قبیل تقسیم سوخ و فلس برداری ازدیاد کرد. از زمان کاشت بذر تا تولید سوخی که توانایی تشکیل گل را دارا باشد، حدود ۶ سال زمان لازم است. با این حال در این روش ازدیاد به دلیل هتروزیگوت بودن والدین، نتایج شبیه به اصل نخواهند شد و به همین دلیل در مورد ارقام تحت کشت باید از طریق رویشی به‌وسیله تقسیم سوخ و فلس برداری اقدام کرد (۲). در مورد بعضی جنس‌ها مثل *Lilium* فلس برداری موفق است ولی در لاله واژگون به دلیل کم بودن تعداد فلس‌ها، محدودیت نقاط مرستمی وجود دارد (۱). بنابراین افزایش انبوه لاله واژگون از طریق کشت درون شیشه‌ای قابل توجه خواهد بود. علاوه بر این موفقیت در ازدیاد درون شیشه‌ای گیاه می‌تواند در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی در جهت انتقال ژن‌های مفید از گونه‌های وحشی به گونه‌های تجارتي بسیار مؤثر باشد. اوکاوا و کیتاجیما (۱۳) کشت درون شیشه‌ای *F. camtschatcensis* را در ۸ هفته و در دمای ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار

دادند. بهترین شرایط برای تشکیل سوخچه در تیمار تاریکی همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد.

شی او و همکاران (۱۵) تولید انبوه گونه *F. hupehensis* را با سه نوع ریزنمونه فلس، ساقه و برگ در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار دادند. بیشترین درصد باززایی سوخچه از ریزنمونه فلس و پس از آن به ترتیب از ریزنمونه ساقه و برگ به دست آمد. هم‌چنین ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA باعث افزایش کالوس‌دهی ریزنمونه و بهبود ریشه‌زایی سوخچه‌های تشکیل شده گردید.

پاک کی و مورفی (۱۴) از کشت درون شیشه‌ای ریز نمونه‌های فلسی گونه *F. thunbergii* درصد بالایی سوخچه به دست آوردند و این سوخچه‌ها بعد از ۱۲ هفته از کشت، تولید برگ و ریشه نمودند. به‌طور میانگین ۱۳/۷ سوخچه از فلس در محیط کشت موراشیگ و اسکوک (MS) همراه با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کیتینین (kin) به دست آمد. کشت‌هایی که در چرخه ۱۶ ساعت روشنایی نور فلورسنت ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، سوخچه‌های مطلوب‌تری نسبت به کشت‌هایی که در تاریکی مطلق در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، تولید کردند.

محمدی ده‌چشمه (۱۰) در پژوهشی با بررسی باززایی غیرمستقیم از ریزنمونه‌های گلبرگ *F. imperialis*، محیط کشت B5 (۴) دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP)، ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) مناسب‌ترین تیمار برای تولید سوخچه به تعداد ۵ عدد به ازای هر ریزنمونه گزارش نمود.

مطالعات موجود در زمینه ریزازدیادی *F. imperialis* از طریق سوخچه بسیار محدود است. با توجه به ارزش تجاری، دارویی و خطر انقراض گیاه *F. imperialis* و هم‌چنین مشکلات موجود در زمینه ازدیاد این گیاه از طریق بذر و تقسیم سوخ، هدف این پژوهش دستیابی به محیطی مناسب جهت

درصد گندزدایی شدند. سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و جهت اطمینان از عدم آلودگی به مدت ۱ هفته به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل شدند.

تیمارها

جهت باززایی مستقیم سوخچه، ریزنمونه‌های عاری از آلودگی به محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۸ گرم در لیتر آگار و ۵/۸ pH به همراه تنظیم کننده‌های رشد IAA (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر)، تیدیاورون (TDZ) (۱، ۰/۲، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، kin (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر)، بنزیل آدنین (BA) (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر)، NAA (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر) و چهار ترکیب هورمونی 1mg/l kin + 1mg/l NAA، 2mg/l kin + 1mg/l NAA، 2mg/l kin + 2mg/l NAA، 1mg/l kin + 2mg/l NAA و 2mg/l kin + 2mg/l NAA به عنوان MS بدون هورمون به عنوان شاهد منتقل شدند. کشت‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ °C و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار و ۳ نمونه در هر تکرار و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی پس از ۸ هفته از کشت، بر باززایی مستقیم سوخچه، تعداد ریشه، اندازه سوخچه و وزن سوخچه لاله واژگون در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است. باززایی مستقیم: بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد روی باززایی گیاه لاله واژگون نشان داد که بیشترین باززایی مستقیم (۸/۳۳) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید می‌شود (شکل ۱) که با تیمار 2 mg/l NAA + 1mg/l kin (۷/۳۳) اختلاف معنی‌دار نشان نداد. کمترین باززایی در تیمار شاهد مشاهده شد که با تیمارهای TDZ و



شکل ۱. سوخچه‌های تشکیل شده در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA

تولید سوخچه در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های حاصل از سوخ است که می‌تواند علاوه بر ازدیاد انبوه، در جهت پیشبرد اهداف اصلاحی نیز مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

سوخ‌های *F. imperialis* مورد استفاده در این پژوهش در اواخر خرداد ماه از منطقه اقلید استان فارس جمع‌آوری شدند و به آزمایشگاه کشت بافت پارک علم و فناوری استان گیلان منتقل و به مدت دو ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت سپری شدن دوران رکود نگهداری شدند.

گندزدایی

ابتدا سوخ لاله واژگون با چاقو باز و تمامی قسمت‌های بیرونی و داخلی آن با آب و مایع ظرفشویی و هم‌چنین با مالش دادن ابر روی آنها به‌طور کامل شسته شدند. سپس نمونه‌ها در زیر هود استریل به مدت ۶۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور گردیدند و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱/۵

جدول ۱. مقایسه میانگین تیمارهای مختلف هورمونی روی باززایی مستقیم، قطر سوخچه و تعداد ریشه در سوخچه‌های تولید شده از کشت فلس گیاه *F. imperialis*

تیمار	تعداد سوخچه مستقیم	تعداد ریشه	قطر سوخچه (میلی متر)	وزن سوخچه (میلی گرم)
شاهد	۱ ^{ed*}	۰ ^f	۴/۳۳ ^h	۷۰ ^{ed}
۱ میلی گرم در لیتر NAA	۴/۳۳ ^b	۵ ^b	۹ ^{egf}	۱۳۰ ^{ed}
۲ میلی گرم در لیتر NAA	۸/۳۳ ^a	۸ ^a	۲۶ ^a	۱۵۹ ^{o a}
۴ میلی گرم در لیتر NAA	۵ ^b	۵ ^b	۱۴ ^{cd}	۴۱۰ ^{cbd}
۱ میلی گرم در لیتر IAA	۱/۳۳ ^{ed}	۰/۳۳ ^{fe}	۵/۳۳ ^{hg}	۸۱ ^{ed}
۲ میلی گرم در لیتر IAA	۱/۳۳ ^{ed}	۱ ^{fed}	۷ ^{hgf}	۱۱۰ ^{ed}
۴ میلی گرم در لیتر IAA	۱/۳۳ ^{ed}	۰ ^f	۶ ^{hgf}	۱۰۰ ^{ed}
۰/۱ میلی گرم در لیتر TDZ	۱/۶۶ ^{ced}	۲ ^{cfed}	۵ ^{hg}	۸۰ ^{ed}
۰/۲ میلی گرم در لیتر TDZ	۱ ^{ed}	۱ ^{fed}	۵/۳۳ ^{hg}	۹۰ ^{ed}
۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ	۰/۶۶ ^e	۰/۶۶ ^{fe}	۳ ^{hi}	۴۰ ^{ed}
۱ میلی گرم در لیتر BA	۰ ^e	۰ ^f	۰ ⁱ	۰ ^d
۲ میلی گرم در لیتر BA	۰ ^e	۰ ^f	۰ ⁱ	۰ ^d
۴ میلی گرم در لیتر BA	۰ ^e	۰ ^f	۰ ⁱ	۰ ^d
۱ میلی گرم در لیتر Kin	۳/۶۶ ^{bc}	۳ ^{cbd}	۹ ^{egf}	۲۱۰ ^{ed}
۲ میلی گرم در لیتر Kin	۴/۶۶ ^b	۳ ^{cbd}	۱۷ ^{cb}	۶۴۰ ^{cb}
۴ میلی گرم در لیتر Kin	۳ ^{cbd}	۱ ^{fed}	۱۰ ^{edf}	۲۷۰ ^{ced}
1 mg/l kin + 1 mg/l NAA	۴/۶۶ ^b	۲/۳۳ ^{ced}	۱۱/۳۳ ^{ed}	۲۰۰ ^{ed}
2 mg/l kin + 1 mg/l NAA	۴/۶۶ ^b	۲/۳۳ ^{ced}	۱۶/۳۳ ^{cb}	۶۶ ^b
1 mg/l kin + 2 mg/l NAA	۷/۳۳ ^a	۳/۳۳ ^{cb}	۲۰ ^b	۷۳۰ ^b
2 mg/l kin + 2 mg/l NAA	۴/۶۶ ^b	۱/۳۳ ^{cfed}	۱۶ ^{cb}	۶۴۰ ^{cb}

*: میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح ۵٪ آزمون توکی اختلاف معنی‌دار ندارند.

IAA تفاوت معنی‌داری نداشت. در هیچ‌یک از تیمارهای دارای BA، سوخچه‌ای تشکیل نشد (جدول ۱).

ریشه‌زایی

بیشترین تعداد ریشه (۸ عدد) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد درحالی‌که کمترین تعداد ریشه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA تولید شد که با تیمار ۲ میلی‌گرم در

لیتر IAA، ۴ میلی‌گرم در لیتر kin + 2 mg/l NAA، ۴ میلی‌گرم در لیتر IAA و غلظت‌های مختلف و تیمارهای گروه TDZ تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در تیمارهای شاهد، ۴ میلی‌گرم در لیتر IAA و غلظت‌های مختلف BA ریشه‌زایی انجام نشد (جدول ۱).

اندازه و وزن سوخچه

بلندترین (۲۶ میلی‌متر) و سنگین‌ترین (۱/۵۹ گرم) سوخچه پس

دست‌کم بخش‌هایی از بافت فلس بدون آلودگی بوده است. به‌همین دلیل می‌توان با حذف و گندزدایی مجدد (چند مرحله‌ای) ریزنمونه‌ها، جداکشت‌های سالمی را از بافت فلس به‌دست آورد.

براساس مطالعات انجام شده روی ریزازدیادی گونه‌های مختلف *Fritilaria*، بیشترین تعداد سوخچه از ریزنمونه فلسی در گیاه *F. camtschaticensi* در تیمار ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱۳)، در گونه *F. hupehensis* در تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱۵) و در گونه *F. thunbergii* در تیمار ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر کیتین گزارش شده است. این تحقیقات نشان می‌دهند که باززایی سوخچه *Fritillaria* در حضور تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه NAA افزایش پیدا کرده است. در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که *F. imperialis* در محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین باززایی مستقیم و رشد را دارد به‌طوری‌که بیشترین تعداد سوخچه در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد، درحالی‌که در هر سه غلظت تیمارهای اعمال شده با BA سوخچه‌ای تشکیل نشد. در واقع BA نه تنها تولید سوخچه را تحریک نکرد بلکه در مقایسه با شاهد مانع از تولید سوخچه نیز شد. این نتایج با گزارش تاتاری و همکاران (۱۶) که عنوان نمودند اثر تیمار BA در ریزازدیادی گیاه سوسن چلچراغ باعث شد تا تعداد پیازچه، وزن پیازچه و تعداد ریشه کمتری نسبت به نمونه شاهد ایجاد شود، مطابقت دارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد که اکسین NAA دارای نقش عمده‌ای در باززایی سوماتیکی لاله واژگون است. کومار و همکاران (۷) با استفاده از NAA بالاترین باززایی را در پیاز زنبق نسبت به هورمون‌های BA و TDZ به‌دست آوردند. با توجه به نتایج، به‌نظر می‌رسد تولید سوخچه در گیاه لاله واژگون بیشتر تحت تأثیر اکسین باشد به‌نحوی که بیشترین تعداد ریشه نیز از ریزنمونه‌های کشت شده در محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. این نتایج با گزارش شی‌او و همکاران (۱۵) که عنوان نمودند NAA باعث افزایش بهبود



شکل ۲. بلندترین سوخچه تشکیل شده در محیط ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA

(قسمت‌هایی از آن درحال تشکیل کالوس و باززایی غیرمستقیم است)

از ۲ ماه در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (شکل ۲). کوچک‌ترین آن در تیمار شاهد با ۴/۳۳ میلی‌متر مشاهده شد که با تیمارهای گروه IAA و TDZ تفاوت معنی‌داری نشان نداد و سبک‌ترین سوخچه از محیط ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ به‌دست آمد (جدول ۱).

بحث

محمدی ده چشمه (۱۲) و غلامی (۵) علی‌رغم اعمال تیمارهای مختلف از قبیل الکل، هیپوکلریت سدیم، کلرید جیوه و تیمار حرارتی موفق به استقرار جداکشت‌های سالم از ریزنمونه فلس لاله واژگون نشدند و در نتیجه از ریزنمونه‌ی گلبرگ استفاده کردند؛ آنها ناموفق بودن خود در به‌دست آوردن ریزنمونه‌های سالم را به آلودگی داخلی باکتریایی مربوط دانستند و به‌همین دلیل به استفاده از جداکشت‌های غیر از سوخ، در ریزازدیادی گیاه لاله واژگون تأکید نمودند. نتایج این پژوهش نشان داد که با فرض وجود آلودگی داخلی در سوخ‌های مورد استفاده، این آلودگی‌ها در تمام قسمت‌های بافت فلس انتشار نداشته و یا

تشکیل شدن تعداد بیشتر ریشه در این غلظت از هورمون باشد که باعث جذب مواد غذایی بیشتر و رشد سریع تر سوخچه می شود. تولید سوخچه های مستقیم از ریزنمونه فلس ۲ ماه بعد از کاشت قابل حصول است درحالی که کالوس دهی و تولید سوخچه غیرمستقیم از روی کالوس حداقل ۴ ماه به طول می انجامد. با توجه به نرخ قابل قبول باززایی مستقیم سوخچه از ریزنمونه های فلسی، این روش راه سریع تری جهت ازدیاد درون شیشه ای گیاه لاله واژگون ارایه می دهد.

سپاسگزاری

از مسئولین و همکاران محترم پارک علم و فناوری استان گیلان به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم در جهت اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

ریشه زایی سوخچه های تشکیل شده گردید، مطابقت داشت. معلمی و چهارزی (۱۱) بیشترین تعداد ریشه را در گیاه گل کاغذی از تیمار NAA به دست آوردند. ماریسکا و همکاران اثر اکسین ها را روی رشد ریشه پیاز سوسن بررسی و بیشترین ریشه زایی را در محیط کشت دارای ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA گزارش کردند. اکسین ها با تأثیر بر تقسیم سلولی، طویل شدن سلول و تمایز سلولی را تحریک می کنند و باعث افزایش تشکیل ریشه های جانبی می شوند (۸). همچنین بیشترین اندازه و وزن سوخچه نیز در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر NAA و سبک ترین سوخچه در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر هومرون TDZ مشاهده شد زیرا در این غلظت از هورمون TDZ، محدود سوخچه های تشکیل شده به جای بزرگ شدن به سمت تولید کالوس تمایل داشتند. اکسین علاوه بر نقش عمده در باززایی در افزایش اندازه سوخچه نیز مؤثر است. دلیل این موضوع می تواند

منابع مورد استفاده

1. Bryan, J. E. 2005. Bulbs. Timber Press. Oregon, London.
2. De Hertogh, A. and M. Lenard. 1993. The physiology of flower bulbs. *Elsevier* 718-739.
3. Eslamzadeh, N., H. Hoseini, H. Moradi and F. Dehkordi. 2009. Introduction of new habitat for the *Fritillaria*, a GIS approach. *Journal of Environmental Sciences and Technology* 11(1): 251-261 (In Farsi).
4. Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
5. Gholami, M. 2007. Micropropagation of of inverted tulip (*Fritillaria imperialis* L.). MSc. Thesis, University of Avicenna. Hamedan, Iran.
6. Khalighi, A. 1997. Floriculture and Ornamental Plants of Iran, Tehran University Press, Iran.
7. Kumar, S., D. R. Sharma, Y. D. Sharma and N. S. Pathania. 2001. *In vitro* propagation of Asiatic hybrid lily from bulb scales. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 71: 463-465.
8. Lincoln, C. and M. Estelle. 1991. The *axr1* mutation of Arabidopsis is expressed in both roots and shoots. *Journal of the Iowa Academy of Science* 98(2): 68-71.
9. MemarMoshrefi, M. 1998. Effect of hormones and environmental conditions on growth and development, bulb propagation and flowering in *Fritillaria*. PhD. Thesis, Horticulture Department., Tarbiat Modarres University. Tehran, Iran.
10. Mohammadi-Dehcheshmeh, M., A. Khalighi, R. Naderi, M. Sardari and E. Ebrahimie. 2008. Petal: A reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. *Acta Physiologia Plantarum* 30: 395-399.
11. Moalemi, N. and M. Chehrazi. 2003. The effect of auxin on rooting of cuttings (with and without leaves) in *Bougainvillea spectabilis*. In: Proceeding of 3th Congress of Horticultural Science Abstracts. Karaj, Iran. pp. 110.
12. Mohamadi-Dehcheshmeh, M. 2005. Using tissue culture techniques in the reproduction of endangered species of the inverted tulip native to Iran. MSc. Thesis, Tehran University. Tehran, Iran.
13. Okawa, M., K. Junya, N. Kei, K. Norico. 1998. Studies on the propagation of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl. by *in vitro* culture. II. Effect of plant hormones on the growth, leaf emergence, and rooting of bulblets. *Japanese Society for Horticultural Science* 68 (1): 184-188.
14. Paek, K. Y. and H. N. Murthy. 2002. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 247-252.

15. Shiau, Y. J., C. D. Tai, C. C. Chen and H. S. Tsay. 2000. Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis*. *Journal of Agricultural Research of China* 49 (4): 29-38.
16. Tatari. M., R. Fotouhi Qazvini and Y. Hamidoghli. 2003. Effect of plant growth regulators and explants in *in vitro* culture of *Lilium ledebourii*. *Journal of Agricultural Sciences* 12: 19-28. (In Farsi)