مؤسسه آموزش عالی علمی

دانشکده علوم

دپارتمان بیولوژی

پایان نامه تحصیلی جهت اخذ درجه کارشناسی در رشته بیولوژی

موضوع :

تکثیر گیاه سوسن چلچراغ

و سه گونه دیگر از جنس لیلیوم با استفاده از روش Micropropagation :

مقایسه روش های ضدعفونی ، تأثیر هورمون های رشد ، و شرایط سازگاری

استاد راهنما :

دکتر نعیم خاضعی

نگارنده :

راوند سمائی کیا

سال تحصیلی : ۸۷ - ۱۳۸۶

شماره پایان نامه : ۰۹ – ۹

تقدیم به :

همه آنان که به من آموختند هر آنچه آموخته ام سرآغازی است برای آموختن جهانی از آنچه نیاموخته ام...

از آغاز زیسته ام که سپاس او گویم و سپاس او در سپاس از خلق اوست

ستایش ذات بی چونی راست که خالق بی نیاز است و دانای راز. خورشید لم یزالش بر همه آفاق وجود پرتو افکنده و نور لایتناهی ذاتش از همه عالم امکان جلوه گر است. جز به لطف و اراده او هیچ امری تحقق نمی پذیرد و نوع انسان هر چه دارد از لطف و عنایت اوست.

بی گمان هیچ تلاشی به نتیجه مطلوب نمی رسد مگر با مساعدت، معاضدت و معاونت جمعی از عزیزان در غایت بزرگواری و نهایت مشقت و شکیبایی، بویژه که آن تلاش کوششی بی توش از قاصری بی هوش چون حقیر پر تقصیر باشد که بی شک زحمات و مشقات را برای مساعدین، مضاعف می کند. لذا بر خود فرض می دانم خاضعانه از همه عزیزانی که مرا در کلیه مراحل علمی، عملی، و تدوین پایان نامه کمک کرده اند تشکر و قدر دانی نمایم.

با سپاس فراوان از :

- استاد بسیار گرانقدر ***جناب آقای دکتر نعیم خاضعی*** که به عنوان استاد راهنما، بی دریغ هر آنچه در توان داشتند در اختیار این حقیر گذاشتند، از ابتدای راه اندازی آزمایشگاه کشت بافت تا آخرین مراحل تدوین پایان نامه، و مرا تا همیشه مرهون بزرگواری ها و عنایت های خویش فرمودند.

- استاد محترم ***آقای مهندس برهان خلّص*** که در مقام استاد مشاور بارها از راهنمایی هایشان استفاده کردم و هدایات علمی و معنوی ایشان که به خصوص در لحظات ناامیدی باعث تجدید قوا برای جستجوی راه حل مناسب می شد.

❖ آقای ***دکتر هادی کریمی*** برای مساعدت های فراوان ایشان در جهت معرفی اولیه سوسن چلچراغ و فراهم کردن شرایط سفر علمی به منطقه بومی این گل.

❖ آقای ***دکتر ادیب روحانی***، رئیس محترم بخش پاتولوژی گیاهی دانشگاه Davis کالیفرنیا، که در تهیه و تصحیح proposal، بنده را یاری فرمودند و در فاصله انجام پروژه همواره در جهت رفع ابهامات و مشکلات، سؤالات مرا پاسخ دادند و صادقانه وقت گرانبهای خویش را در اختیار من نهادند.

❖ ***خانم دکتر داروگر***، متخصص باکتریولوژی، که زحمت تشخیص جنس باکتری آلوده کننده محیط های کشت سوسن چلچراغ را بی هیچ منتی قبول فرمودند.

❖ ***خانم مهندس نانکلی***، متخصص کشت بافت گیاهی مؤسسه بیوتکنولوژی، که صمیمانه بنده را در یک دوره یک ماهه آموزش تخصصی کشت بافت بدون دریافت هیچ وجهی به عنوان تنها دانشجوی خود پذیرفتند و برای همیشه مرا وامدار محبت خویش نمودند.

❖ ***سرکار خانم مهرنوش دهقانی***، که با وجود مشغله تحصیلی فراوان در دانشگاه "Queens" کانادا همواره مرا در تهیه مقالاتی که امکان دسترسی به آنها در داخل کشور میسر نبود بی دریغ یاری نمودند.

❖ ***سرکار خانم رویا دادور*** که این حقیر را قرین محبت های بی دریغ خویش ساخته و در بسیاری از امور وقت گیر مانند آماده سازی مواد و لوازم کشت و شستشو و تمیز کردن محیط کار و رسیدگی به گیاهچه ها و...بنده را یاری رساند.

❖ آقای مهندس اشراقی که در معرفی این حقیر به مؤسسات و اشخاص علمی نقش به سزایی داشتند، آقای کامبیز بیک پور که در تهیه نمونه های گیاهی از منطقه داماش گیلان و نگهداری آنها در سهیلیه کرج بی هیچ منتی بنده را یاری نمودند، آقای اکبری که در ساخت تعدادی از قطعات مورد احتیاج و همچنین انجام بسیاری از امور تأسیساتی و برقی که بنده واقعاً از انجام آنها قاصر بودم زحمات فراوان کشیدند و همه کسانی که به نحوی در انجام این تحقیق یاریگر من بوده اند ولی نامشان بر اثر کوتاهی حقیر از قلم افتاده است.

و...

سپاس و ستایش بی منتهی از

پدر و مادر مهربانم که علم ، ثروت ، عشق ، زندگی و هر آنچه در گذشته ، حال و آینده داشته ام ، دارم و خواهم داشت مدیون فداکاری های آنانم.

کرج - زمستان ۸۶

راوند سمائی کیا

« زندگی در صدف خویش گوهر ساختن است

در دل شمع فرو رفتن و نگداختن است

عشق از این گنبد سربسته برون تاختن است

شیشه ماه ز طاق فلک انداختن است

مذهب زنده دلان خواب پریشانی نیست

از همین خاک جهان دگری ساختن است »

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

علائم و نشانه های به کار رفته در متن

چکیده (Abstract)

۱. فصل اول : مقدمه..... ۱

اهداف پروژه..... ۱۲

۲. فصل دوم : مروری بر منابع ۱۳

۲,۱. گل لیلیوم ۱۴

۲,۲.گیاه شناسی تیره لیلیاسه..... ۱۵

۲,۲,۱. پراکنش و گیاهشناسی جنس لیلیوم..... ۱۷

۲,۳.گیاهشناسی و پراکنش گل سوسن چلچراغ ۱۹

۲,۳,۱. منطقه رویش داماش ۲۲

۲,۳,۲. منطقه رویش درفک ۲۳

۲,۴.طبقه بندی جنس لیلیوم ۲۳

۲,۵.ترکیبات شیمیایی و خواص درمانی لیلیوم ۲۶

۲,۶.روش های تکثیر لیلیوم ۲۸

۲,۶,۱. تکثیر جنسی لیلیوم ۲۹

۲,۶,۱,۱. طبقه بندی جوانه زنی بذور لیلیوم ۳۰

۲,۶,۲. تکثیر غیر جنسی یا رویشی لیلیوم ۳۱

۲,۶,۲,۱. تمایز اندام ها ۳۲

۲,۶,۲,۲. مورفولوژی پیاز گل لیلیوم ۳۴

۲,۶,۲,۳. تکثیر توسط تقسیم پیاز ۳۵

۲,۶,۲,۴. تکثیر توسط پیازچه های هوایی ۳۶

۲,۶,۲,۵. تکثیر از طریق قلمه برگی ۳۸

۲,۶,۲,۶. تکثیر از طریق فلس های پیازی (فلس برداری) ۳۹

۲,۷.تکثیر لیلیوم از طریق کشت بافت گیاهی ۴۲

۲,۷,۱. تاریخچه کشت بافت گیاهی ۴۲

۲,۷,۲. مبانی کشت بافت ۴۴

۲,۷,۳. موارد استفاده از کشت بافت ۴۶

۲,۷,۴. ریزازدیادی ۴۷

۲,۷,۵. معایب ریزازدیادی ۴۷

۲,۷,۶. انواع باززایی در کشت بافت ۴۸

۲,۸.تنظیم کننده های رشد ۵۱

۲,۸,۱. تنظیم کننده های رشد اکسینی ۵۲

۲,۸,۱,۱. انتقال اکسین در گیاه ۵۳

۲,۸,۱,۲. مکانیسم عمل اکسین ۵۵

۲,۸,۱,۳. اکسین های مصنوعی ۵۷

۲,۸,۲. تنظیم کننده های رشد سایتوکینینی ۵۹

۲,۸,۲,۱. اثرات فیزیولوژیک سایتوکینین ها ۶۰

۲,۸,۲,۲. مکانیسم عمل سایتوکینین ها ۶۲

۲,۹.مروری بر تحقیقات انجام شده ۶۵

۲,۹,۱. تأثیر عوامل مختلف بر فلس برداری لیلیوم ۶۵

۲,۹,۱,۱. اثر تنظیم کننده های رشد ۶۵

۲,۹,۱,۲. اثر رقم در فلس برداری ۶۷

۲,۹,۱,۳. اثر رطوبت، دما، و بستر کاشت ۶۷

۲,۹,۱,۴. اثر تغییرات فصلی در ظهور برگ ۶۹

۲,۹,۲. تأثیر عوامل مختلف بر کشت بافت لیلیوم ۷۰

۲,۹,۲,۱. اثر تنظیم کننده های رشد ۷۰

۲,۹,۲,۲. اثر بخش های مختلف فلس ۷۳

۲,۹,۲,۳. اثر تیمار نوری ۷۵

۲,۹,۲,۴. اثر دما ۷۷

۲,۹,۲,۵. اثر محیط کشت و ساکارز ۷۸

۲,۹,۲,۶. اثر نوع و اندازه ریزنمونه ۸۰

۲,۹,۲,۷. اثر پروتئین ها و پلی آمین ها ۸۱

۲,۹,۲,۸. رکود و برطرف کردن آن ۸۳

۳. فصل سوم : مواد و روش ها ۸۶

۳,۱.مواد گیاهی ۸۷

۳,۱,۱. تهیه ۸۷

۳,۱,۲. نحوه ذخیره کردن ۸۸

۳,۲.روش های ضد عفونی ۸۹

۳,۲,۱. ضد عفونی سطح ریزنمونه های سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۸۹

۳,۲,۲. ضدعفونی سطحی ریزنمونه های گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۹۱

۳,۲,۳. ضد عفونی وسایل آزمایشگاهی ۹۲

۳,۳.تهیه محیط کشت ۹۳

۳,۳,۱. تهیه محلول های ذخیره ۹۵

۳,۳,۱,۱. محلول ذخیره عناصر پر مصرف ۹۶

۳,۳,۱,۲. محلول ذخیره عناصر کم مصرف ۹۶

۳,۳,۱,۳. محلول ذخیره آهن ۹۶

۳,۳,۱,۴. محلول ذخیره عناصر کم مصرف مس و کبالت ۹۷

۳,۳,۱,۵. محلول ذخیره ویتامین ها ۹۷

۳,۳,۱,۶. محلول ذخیره هورمون های رشد ۹۸

۳,۳,۲. محیط کشت جوانه زایی ۹۸

۳,۳,۳. محیط کشت کالوس زایی ۱۰۰

۳,۳,۴. محیط کشت ریشه زایی ۱۰۱

۳,۳,۴,۱. سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۱۰۱

۳,۳,۴,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۱۰۲

۳,۴.مراحل کشت بافت ۱۰۲

۳,۴,۱. استقرار ریز نمونه ها ۱۰۲

۳,۴,۲. نحوه ازدیاد پیازچه ها ۱۰۴

۳,۴,۲,۱. با استفاده از ریزنمونه ۱۰۴

۳,۴,۲,۲. با استفاده از کالوس ۱۰۵

۳,۴,۳. انتقال به محیط ریشه زایی ۱۰۶

۳,۵.شرایط داخل ژرمیناتور ۱۰۷

۳,۶.انتقال به خاک و سازگاری ۱۰۸

۳,۶,۱. عملیات برای سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۱۰۸

۳,۶,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۱۱۱

۳,۶,۳. شرایط اتاق سازگاری ۱۱۱

۴. فصل چهارم : مشاهدات و نتایج ۱۱۲

۴,۱.مرحله اول : ضد عفونی سطحی ۱۱۵

۴,۱,۱. مقایسه سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۱۱۵

۴,۱,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۱۱۹

۴,۲.مرحله دوم : از کشت ریزنمونه تا تولید گیاهچه ۱۲۲

۴,۲,۱. مقایسه سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۱۲۲

۴,۲,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۱۲۹

۴,۲,۲,۱. تأثیر هورمون های رشد بر شکل فلس و پیازچه ۱۳۰

۴,۲,۲,۲. تأثیر هورمون های رشد بر میزان پیازچه زایی، تعداد فلس، و وزن پیازچه ... ۱۳۲

۴,۲,۲,۳. تأثیر هورمون های رشد بر کالوس زایی ۱۳۳

۴,۲,۲,۴. تأثیر هورمون های رشد بر ریشه زایی ۱۳۵

۴,۳.مرحله سوم : ریشه زایی ۱۳۷

۴,۳,۱. مقایسه سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۱۳۷

۴,۳,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۱۴۲

۴,۴.مرحله چهارم و پنجم : انتقال به خاک و سازگاری ۱۴۳

۴,۴,۱. مقایسه سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۱۴۳

۴,۴,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۱۴۸

۵. فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری ۱۵۴

۵,۱.استفاده از فلس های میانی و نیمه پائینی فلس ۱۵۶

۵,۲.آلودگی ۱۵۸

۵,۳.قهوه ای شدن ۱۶۹

۵,۴.تأثیر هورمون های رشد ۱۷۳

۵,۴,۱. مقایسه سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor" ۱۷۵

۵,۴,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss ۱۸۰

۵,۵.رکود پیازچه ها ۱۸۳

۵,۶.سازگاری ۱۸۸

۵,۶,۱. سازگاری سوسن چلچراغ با منطقه (سهیلیه) کرج ۱۹۱

پیشنهادات **۱۹۳**

فرهنگ اصطلاحات **۱۹۵**

۶. منابع **۲۰۱**

۶,۱. منابع فارسی ۲۰۲

۶,۲. منابع خارجی ۲۰۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

۱. جدول ۱-۱ : تولید گلهای پیازی در هلند (برحسب میلیون گیاه) ۷

۲. جدول ۱-۲ : تولید گیاهان از طریق کشت بافت طی سال ۹۹-۱۹۹۸ (میلیون گیاه) ۴۳

۳. جدول ۱-۳ : جزئیات سه روش ضدعفونی پیاده شده بر روی سه گونه لیلیوم مورد آزمایش ۹۱

۴. جدول ۲-۳ : غلظت و اجزای تشکیل دهنده محیط کشت اصلی MS و محلول های ذخیره ۹۴

۵. جدول ۳-۳ : پنج گروه کشت شده از ریزنمونه های سوسن چلچراغ ۱۰۰

۶. جدول ۱-۴ : نتایج حاصل از بررسی پنج گروه کشت شده از ریزنمونه های سوسن چلچراغ پس از ۱۰ هفته ۱۲۹

۷. جدول ۲-۴ : بیشترین تعداد پیازچه تشکیل شده بر روی کالوس های گونه سوسن چلچراغ در غلظت های هورمونی مختلف ۱۳۵

۸. جدول ۳-۴ : بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه حاصل از گونه سوسن چلچراغ در غلظت های هورمونی مختلف ۱۳۶

۹. جدول ۴-۴ : میانگین طول بلندترین ریشه های حاصل از ۱۰ گیاهچه ریشه دار شده (میلی متر) و بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه حاصل از سه گونه لیلیوم مورد آزمایش در انتهای یک دوره چهار هفته ای رشد در سه محیط ریشه زایی ۱۴۱

۱۰. جدول ۵-۴: میانگین طول بلندترین ریشه های حاصل از ۱۰ گیاهچه ریشه دار شده (میلی متر) و بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه حاصل از سوسن چلچراغ در انتهای یک دوره چهار هفته ای رشد در سه محیط ریشه زایی به کار گرفته شده ۱۴۳

۱۱. جدول ۱-۵: مقایسه میزان تأثیر و ویژگی های استریل کننده های سطحی که به طور معمول برای استریل کردن مواد گیاهی به کار می روند ۱۶۰

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

۱. نمودار ۱-۱ : طرح کلی از سیستم ارزیابی گیاهان جدید در صنعت گلکاری ۹

۲. نمودار ۱-۴ : مقایسه سه روش ضدعفونی در سه گونه لیلیوم در یک دوره هشت هفته ای ۱۱۵

۳. نمودار ۲-۴ : مقایسه میزان جوانه زنی ریزنمونه های سه گونه لیلیوم در یک دوره هشت هفته ای..۱۲۲

۴. نمودار۳-۴ : مقایسه میانگین تعداد پیازچه بر روی هر ریزنمونه هر یک از سه گونه لیلیوم مورد آزمایش پس از چهارهفته..... ۱۲۵

۵. نمودار ۴-۴ : مقایسه گلدان های سازگار شده حاوی گیاهچه هایی با ریشه هایی در سه طول متفاوت.....۱۴۵

فهرست اشکال و عکس ها

عنوان **صفحه**

۱. شکل ۱- ۲ : نمونه ای از یک گل لیلیوم و پیاز آن (Wallich's lily)..... ۱۶

۲. شکل ۲-۲ : فرم انواع گل در جنس لیلیوم ۱۸

۳. شکل ۳-۲ : پراکنش گل سوسن چلچراغ در کشور ایران ۲۱

۴. شکل ۴-۲ : یک روش مصنوعی برای تولید پیازچه های هوایی ۳۷

۵. شکل۵-۲ : نمای کلی فرضیه اسمز شیمی در انتقال اکسین ۵۵

۶. شکل۶-۲ : فرمول شیمیایی شش گروه از اکسین های مصنوعی ۵۸

۷. عکس ۱-۳ : (a) از راست به چپ پیاز "Tresor" *Asiatic Lily* ، "Acapulco" ، "Cebeco Dazzle" *LA Hybrid Lily* . (b) پیاز *L. ledebourii* (Baker) Boiss (سوسن چلچراغ) ۸۸

۸. عکس ۲-۳ : دستگاه هود لامینار (میکروبیولوژی) ۸۹

۹. عکس ۳-۳ : مراحل استقرار ریزنمونه ها ۱۰۴

۱۰. عکس ۴-۳ : تعدادی ریزنمونه که پس از چهار هفته از محیط خارج شده و برای انجام عمل ازدیاد به فضای استریل انتقال داده شده اند ۱۰۵

۱۱. عکس ۵-۳ : (a) نمونه ای از دو توده کالوس کشت شده که در حال تولید گیاهچه می باشند . (b) چهار گیاهچه کشت شده در سمت چپ اولین لوله سمت راست ، همه از روی کالوس همان لوله اول جدا شده اند و در محیط ریشه زایی کشت شده اند ۱۰۶

۱۲. عکس ۶-۳ : دو ریزنمونه که هریک دارای چندین گیاهچه مناسب برای انتقال به محیط ریشه زایی می باشند. راست: "Tresor" ، چپ: "Ceb Dazzle" ۱۰۷

۱۳. عکس۷-۳ : نمایی از دستگاه ژرمیناتور ۱۰۸

۱۴. عکس ۸-۳ : مراحل انتقال به خاک ۱۱۰

۱۵. عکس ۱-۴ : تعدادی از لوله های آلوده از هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش..... ۱۱۶

۱۶. عکس۲-۴ : (a) آلودگی قارچی دور از گیاهچه (b) نمونه ای از گروه دوم یک هفته پس از انتقال..... ۱۱۹

۱۷. عکس ۳-۴ : نمونه ای از یک محیط آلوده در نمای جانبی (a) و نمای سطحی محیط (b). تغییر رنگ تدریجی محیط آلوده و از بین رفتن گیاهچه (c). رشد محدود آلودگی اطراف گیاهچه (ریشه های جدید داخل محیط) (d) ۱۲۱

۱۸. عکس ۴-۴ : بعضی از ریزنمونه ها در همان هفته های اول پس از کشت بدون هیچگونه تولید جوانه ای قهوه ای می شدند (a). بعضی نیز حتی پس از اینکه پیازچه هایی تولید می کردند قهوه ای شده و تدریجاً باعث تغییر رنگ محیط هم می شدند (b). مقایسه محیط تغییر رنگ یافته و تغییر نیافته گرچه در هر دو ریزنمونه و جوانه های آنها قهوه ای شده و مرده اند (c) ۱۲۴

۱۹. عکس ۵-۴ : پیازچه های حاصل از گونه "Acapulco" (a)، گونه "Ceb Dazzle" (b)، و گونه "Tresor" (c) سه هفته پس از کشت ریزنمونه های آنها در محیط MS ۱۲۶

۲۰. عکس۶-۴ : کالوس تشکیل شده از یک ریزنمونه "Ceb Dazzle" و گیاهچه های تشکیل شده بر روی همان ریزنمونه ۱۲۷

۲۱. عکس۷-۴ : گاهی در کنار یک گیاهچه طبیعی اشکال غیر طبیعی و کالوس-مانند هم رشد می کرد (a). مقطع عرضی از زوائد ریشه-مانند همان گیاهچه غیر طبیعی در شکل a (b) ۱۲۸

۲۲. عکس ۸-۴ : پیازچه های حاصل از ریزنمونه های گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss پس از ده هفته کشت در محیط MS حاوی Control (a) . 0.1 mg/l BA (b) ، 1 mg/l BA (c) ، 0.1 mg/l NAA (d) و 1 mg/l NAA (e) ۱۳۱

۲۳. عکس۹-۴ : کالوس های حاصل از ریزنمونه های گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss و پیازچه های تشکیل شده بر روی آنها پس از ده هفته کشت در محیط MS حاوی 0.1 mg/l NAA (a),(e) ، 1 mg/l BA (b) ، و 1 mg/l NAA (c),(f) ۱۳۴

۲۴. عکس۱۰-۴ : تشکیل ریشه های نابه جا از خود کالوس که با پیازچه در ارتباط نیستند در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر NAA در یک ریزنمونه (a) هفته ششم و (b) همان ریزنمونه در هفته دهم ۱۳۷

۲۵. عکس ۱۱-۴ : میزان ریشه زایی هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش پس از چهار هفته کشت در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BA و ۱ میلی گرم در لیتر NAA (a) "Acapulco" ، (b)

"Ceb Dazzle" ، و (c) "Tresor". (d) رشد توده ای قطور و نا مشخص در این محیط در یک گیاهچه Dazzle..... ۱۳۹

۲۶. عکس۱۲-۴ : میزان ریشه زایی و افزایش رشد طولی پس از انتقال گیاهچه های هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش به محیط های MS حاوی ۰/۵ (a, b, d) و ۱ میلی گرم در لیتر IBA (c , e) به مدت چهار هفته دیگر. (a) گیاهچه "Acapulco" ، (b و c) گیاهچه "Ceb Dazzle" ، (d و e) گیاهچه "Tresor" ۱۴۰

۲۷. عکس۱۳-۴ : پیازچه های ریشه دار شده سوسن چلچراغ پس از چهار هفته در محیط MS حاوی control (a) ، 0.5 mg/l IBA (b) ، 0.1 mg/l NAA (c) ، 1 mg/l NAA (d).....۱۴۲

۲۸. عکس۱۴-۴ : گیاهچه های کاشته شده هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش سه هفته پس از انتقال به اتاق سازگاری (a) گیاهچه "Acapulco" ، (b) گیاهچه "Ceb Dazzle" ، و (c) گیاهچه "Tresor" ۱۴۶

۲۹. عکس ۱۵-۴ : رشد کاملاً مشخص گیاهچه ها (a) سه هفته پس از انتقال به گلخانه (b) ۱۴۷

۳۰. عکس ۱۶-۴ : (a) گیاهچه (پیازچه) کاشته شده سوسن چلچراغ سه هفته پس از انتقال به اتاق سازگاری . (b) سه هفته پس از انتقال به گلخانه ۱۴۸

۳۱. عکس ۱۷-۴ : نمایی از روستای داماش که پایه های گیاهی از داخل حیاط یکی از همین منازل تهیه شد! ۱۴۹

۳۲. عکس۱۸-۴ : (a) یک پایه از گل سوسن چلچراغ چهار هفته پس از کاشته شدن در منطقه سهلیه کرج . (b) همان پایه ده روز بعد ۱۵۱

۳۳. عکس ۱۹-۴ : نمونه ای از گل های هر چهار گونه لیلیوم مورد استفاده در این آزمایشات . سه گونه اول (a) "Acapulco" ، (b) "Ceb Dazzle" و (c) "Tresor" در گلخانه مربوط به آزمایشگاه بیولوژی پرورش داده شده و گونه چهارم (d ، e) *L. ledebourii* (Baker) Boiss یا سوسن چلچراغ در منطقه بومی خود (ارتفاعات داماش) توسط نگارنده عکس برداری شده است ۱۵۳

علائم و نشانه های به کار رفته در متن

ABA	abscissic acid
BA	6-benzyladenine
CK	cytokinin
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid
GA	gibberellic acid
gr	gram
IAA	indole-3-acetic acid
IBA	indole-3-butyric acid
2ip	(?,?-dimethylallylamino) purine
KD	kilo Dalton
Kin	kinetin = 6-furfurylamino purine.
LTS	Low Temperature Sweetening
mgl^{-1}	milligram per liter
µl	microliter
µ mol $m^{-2}s^{-1}$	micro mole / square meter*second
mM	millimolar
MS	Murashige and Skoogs medium (1962)
NAA	a-naphtaleneacetic acid
PIC	(picloram) 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid
ppm	part per million
TDZ	(thidiazuron) N-(1,2,3-thiadiazol-5yl)-N'-phenylurea
W	watt
W/V	Weight / Volume
V/V	Volume / Volume
Zeatine	6[4-hydroxy-3-methyl-2-butenylamino] purine

چکیده

هدف اصلی از تحقیق حاضر دستیابی و پیاده سازی تکنیک کشت بافت گیاهی و تکثیر گیاه نادر و در حال انقراض سوسن چلچراغ (*L. ledebourii* (Baker) Boiss.) با استفاده از یکی از رایج ترین روش های این تکنیک یعنی Micropropagation می باشد. مراحل کلی این روش که سه مرحله اول آن در شرایط کاملاً استریل انجام می شوند به ترتیب شامل : (۱) ضدعفونی سطحی بافت گیاهی و تهیه ریزنمونه (۲) کشت ریزنمونه ها در محیط جوانه زایی (۳) انتقال گیاهچه های حاصل به محیط ریشه زایی (۴) انتقال گیاهچه های ریشه دار شده از لوله های آزمایش به خاک و قرار دادن آنها در اتاق سازگاری (۵) انتقال گیاهچه های سازگار شده به گلخانه، می باشد.

ابتدا این مراحل بر روی سه گونه دیگر از جنس لیلیوم به نام های *Oriental Hybrid lily* "Acapulco"، *Longiflorum-Asiatic (L.A.) Hybrid lily* "Cebeco Dazzle"، و *Asiatic lily* "Tresor" انجام گردید. بافت گیاهی مورد استفاده در همه آزمایشات فلس های پیازی بود و نتایج پس از یک دوره هشت هفته ای رکورد گردیدند به این صورت که :

کمترین آلودگی (۹ ٪) از ضدعفونی سطحی فلس های گونه "Tresor" با قرار دادن آنها در قارچ کش بنومیل ۰/۳ ٪ به مدت ۳۰ دقیقه و دو بار آبکشی با آب مقطر استریل هر بار به مدت سه دقیقه، فرو بردن در اتانول ۷۰ ٪ به مدت ۳ دقیقه و دو بار آبکشی هر بار به مدت سه دقیقه، غوطه ور کردن در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ ٪ به مدت ۳۰ دقیقه و سه بار آبکشی به مدت ۳، ۴، و ۵ دقیقه به دست آمد. در مورد سوسن چلچراغ نیز همین روش به کار گرفته شد لکن از هیپوکلریت ۲/۵ ٪ و قارچ کش مرغوب تردینوکاپ استفاده شد که در نتیجه آلودگی سطحی به کلی حذف گردید. در این گونه لیلیوم، باکتری *Klebsiella* به صورت درون بافتی مشاهده شد و حضور این باکتری endophytic برای اولین بار گزارش گردید.

بیشترین درصد پیازچه زایی در ریزنمونه های گونه "Acapulco" (۱۰۰ ٪) که در محیط MS حاوی ۰/۱ mg/l NAA + ۰/۱ mg/l BA کشت شده بودند با میانگین ۴/۸ پیازچه بر روی هر ریزنمونه حاصل شد و کمترین آن در ریزنمونه های گونه "Tresor" که در محیط MS بدون

هورمون کشت شده بودند با میانگین ۱/۶ به دست آمد. بالاترین تعداد ریزنمونه قهوه ای شده نیز در این گونه مشاهده گردید. ریزنمونه های گونه "Cebeco Dazzle" که ابتدا در غلظت ۰/۱ mg/l BA + ۰/۱ mg/l NAA کشت شده و از هفته چهارم به بعد به غلظت هورمونی ۰/۵ mg/l BA + ۰/۱ mg/l NAA انتقال یافتند، مقادیر زیاد کالوس تولید نموده و این کالوس ها بیشترین تعداد پیازچه با میانگین ۱۰/۴ را ایجاد کردند. در مورد سوسن چلچراغ ، بالاترین میانگین تعداد پیازچه بر روی هر ریز نمونه (۳/۵) در محیط MS حاوی ۰/۱ mg/l NAA ، بیشترین میزان پیازچه های ریشه دار (۵۹ ٪) هم در همین غلظت هورمونی، بالاترین میانگین تعداد فلس در هر پیازچه (۵/۲) در غلظت ۰/۱ mg/l BA ، بیشترین میانگین وزن تر هر پیازچه (۱۱۰/۳ mg) در غلظت ۱ mg/l NAA ، و بیشترین تعداد توده های کالوس نیز در همین غلظت به دست آمد.

بیشترین میزان ریشه زایی در هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش، در محیط MS حاوی ۰/۵ mg/l IBA با میانگین رشد طولی ۲۶، ۳۱ ، و۲۷ میلیمتر و بیشترین تعداد ریشه های تشکیل شده ی ۶ ،۱۱ و ۷ به ترتیب برای گونه اول تا سوم به دست آمد. در مورد سوسن چلچراغ بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه در همین غلظت حاصل شد لکن بالاترین میانگین رشد طولی (۲۰ میلیمتر) در غلظت ۱ mg/l NAA مشاهده گردید.

تمام (۱۰۰ ٪) گیاهچه های حاصل از هر سه گونه پس از انتقال به خاک و قرار دادن در اتاق سازگاری در مدت یک تا دو ماه به خوبی با شرایط خارج از لوله آزمایش سازگارگردیدند. لکن گیاهچه هایی که ریشه های بلندتری داشتند (بیش از ۳ سانتی متر) به زمان کمتری برای سازگاری نیاز داشته و پس از انتقال به گلخانه نیز زودتر علائم رشد را نشان دادند. اکثر پیازچه های حاصل از کشت بافت، در گونه سوسن چلچراغ به صورت dormant بوده و پس از انتقال به خاک نیز گیاهچه ای تولید ننمودند اگرچه هیچ یک از بین نرفته و همچنان سبز باقی ماندند.

کلمات کلیدی : لیلیوم ، کشت بافت ، Micropropagation ، ریزنمونه ، کالوس ، هورمون های رشد ، سازگاری

فصل اول

مقدمه

زمانیکه چلچراغ آسمان خاموش می شود و خورشید با لبخند همیشگی، زوال شب و زیبائیهایش را به سخره می گیرد و سرمست از پیروزی به امحاء آثارش می پردازد، یادگاری از شب بر جای می ماند. آنقدر زیرکانه که خورشید اسیر حیله شب شده و خود موجب تجلی بیشترش می گردد، و چنان وفادار به شب که روی به خورشید نمی نماید بلکه روی به زمین دارد.

سوسن چلچراغ قندیل زیبایی است که هر چشمی را به بازی می گیرد.

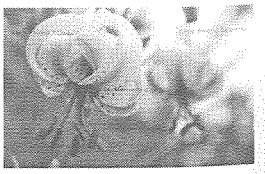
(شکرایی ، ۱۳۷۹)



انسان گرفتار در زندگی ماشینی از آنجائیکه حفظ طبیعت ویژگی ذاتی اوست، آرزوی بازگشت به دامان طبیعت را حتی با آوردن بخشی از طبیعت به اطاق خویش در هیئت یک گلدان یا شاخه ای گل در دل خود زنده نگاه می دارد. گل به عنوان جلوه ای زیبا از نعمات خداوندی و نمودی پویا از عشق و سازندگی، همواره در طول تاریخ الهام بخش ادبیات و فرهنگ ملی ما ایرانیان بوده است. در فرهنگ ما شاخصترین رنگها سبز فیروزه ای و پر طرفدارترین نقوش، نقش گل و بلبل است. زمانی که گلها در محیط خودرو و طبیعی یا درون شهرها شکوفا می شوند، مناظر بدیع و شگفت انگیزی را خلق میکنند که سبب آرامش خاطرمان می گردند. از طرفی گلها فرصتهای مناسبی را برای ابراز علاقه و دوستی و در غم ها و شادی های انسان خلق می کنند و به ما اجازه می دهند تا افکارمان را به سادگی منتقل نمائیم.

سرزمین ایران با وسعت km^2 ۱،۶۴۸،۱۰۰ از نظر تنوع گیاهی بسیار غنی است و در حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی را شامل می گردد. کشور ایران یکی از مراکز اصلی گونه های بومی[1] گیاهی در جهان است. این گونه ها به ۱۵۰ تیره تعلق دارند و بالغ بر ۱۷۲۷ گونه بومی را شامل می گردند که تقریباً ۲۵٪ کل گونه ها می شود. ۱۵٪ گونه های بومی ایران را گونه های علفی یکساله، درختچه ها[2] و درختان و ۸۵٪ باقیمانده را گیاهان علفی چند ساله تشکیل می دهند (Jalili and Jamzad, 1999). چنین موقعیتی این امکان را بما می دهد تا بتوانیم با هوشیاری و بهره گیری صحیح از استعدادهایی چون آفتاب درخشان، خاک مرغوب، نیروی کار ارزان، امکان استفاده از انرژی های فسیلی و با داشتن اقلیم های گوناگون بتوانیم در زمره تولید کنندگان و صادر کنندگان بزرگ گل و گیاه در جهان قرار بگیریم.

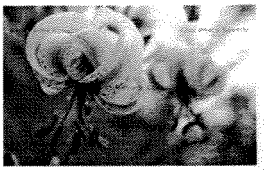
[1] Endemic
[2] Shrubs



از نظر سطح زیر کشت در بین کشورهایی که به پرورش و تولید گل مبادرت می ورزند، چین با ۱۵٪ سهم در رتبه نخست قرار گرفته و پس از آن ژاپن ۹/۴٪، آمریکا ۴/۴٪، برزیل و هلند ۳/۵٪ از کل سطح زیر کشت گل و گیاهان زینتی جهان را به خود اختصاص داده اند. در این میان کشور ایران در بین ۴۲ کشور عمده تولید کننده گل و گیاهان زینتی در رتبه ۱۶ قرار داشته و سطح زیر کشت آن نسبت به سطح زیر کشت جهانی از ۱/۳٪ جهانی فراتر نمی رود. از سوی دیگر از حیث میانگین ارزش تولید، گروهبندی کشورها نشانگر آنست که ژاپن، هلند، آمریکا، و ایتالیا، به ترتیب رتبه های اول تا چهارم را با سهم ۱۷/۸٪ ژاپن، ۱۷٪ هلند، ۱۵٪ آمریکا، ۱۳٪ ایتالیا به خود اختصاص داده اند. در این بین کشور ایران در رتبه ۳۵ قرار گرفته و میانگین ارزش تولیدات آن طی دوره مورد نظر در سالهای ۱۹۸۵-۱۹۹۵ در حدود ۰/۵ میلیون دلار و سهم آن معادل ۰/۰۰۲ درصد بوده که بسیار ناچیز و اندک می باشد. (بشیر اعظمی، ۱۳۷۶).

به طور کلی آمارها نشان می دهند که صادرات گل ایران از سال شروع آن یعنی ۱۳۷۰ تا کنون یک روند صعودی داشته به طوریکه ارزش صادرات گل و گیاهان زینتی ایران از حدود ۲۸۷۰۰۰۰ دلار در سال ۱۳۷۲ به نزدیک ۲۰ میلیون دلار در سال ۱۳۸۰ (ایرانشاهی،۱۳۸۰) و به حدود ۶۰ میلیون دلار در سال جاری رسیده است (خیام نکویی، ۱۳۸۵). با این حال همانطور که ذکر شد ایران با دارا بودن استعدادهای فراوان بالقوه در این زمینه، با این درآمد چند میلیونی هنوز با جایگاه واقعی خود در بازار ده ها میلیارد دلاری جهانی فاصله زیادی دارد و برای جبران این فاصله، افزایش سطح کیفی و کمی تولید، به خصوص با به کار گیری جدیدترین امکانات و اطلاعات روز دنیا و تطابق با استانداردهای بین المللی الزامی می باشد.

به دست آوردن گیاهان محلی و خودرو برای استفاده بالقوه و بالفعل در صنعت گیاهان زینتی یک امر ضروری برای تحقیقات و ایجاد نوآوری های علمی در باغبانی است. دسترسی مداوم به بهره



برداری از تنوع ژنتیکی که در طبیعت یافت می شود اهمیت زیادی در تکامل و بهبود محصولات زینتی دارد. پتانسیل خزانه طبیعت هنوز به میزان زیادی نا شناخته مانده است و باید تحقیقات بیشتری بر روی آنها انجام بگیرد. حداقل یک درصد گیاهان خودرو میتوانند بمنظور استفاده های زینتی کاربرد داشته باشند. گیاهان خودرو برای ایجاد نوآوری در گلکاری به چند دلیل ضروری هستند:

۱. اغلب گیاهانی که در منشأ طبیعی خود یافت می شوند، گیاهانی مقاوم نسبت به انواع خاصی از بیماری ها و آفات می باشند و به همین دلیل دارای پتانسیل بالایی برای بهبود ژنتیکی محصولات موجود هستند.

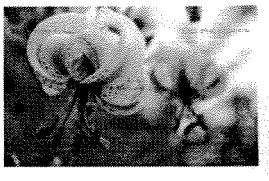
۲. وقتی جمعیت های متفاوتی از یک گونه خاص در ناحیه انتشار طبیعی آن مورد مطالعه قرار می گیرد، ممکن است به جمعیت هایی برخورد کرد که از نظر ژنتیکی با مناطق سرد یا خشک به خوبی انطباق یافته اند.

۳. به منظور استفاده های دارویی یا استفاده های گیاهشناسی و مؤسسات تحقیقاتی (Hannipman, 2000).

به جرأت می توان گفت که در حال حاضر در سرتاسر جهان چندین هزار گونه گیاهی خودرو در معرض خطر انقراض و یا بهره برداری بی رویه قرار گرفته اند. برخی از این گونه ها دارای پتانسیل اقتصادی بالا یا واجد ژنهای ارزشمندی هستند که در کارهای اصلاح ژنتیکی بسیار مورد توجه قرار می گیرند، در نتیجه برای متخصصین ژنتیک بسیار جالب توجه اند و حتی برای سایر کشورها نیز منبع خوبی در کارهای بهنژادی می باشند.

یکی از گیاهان خودرو ولی در معرض خطر انقراض کشور ایران، گلی از خانواده لیلیوم ها[1] به نام سوسن چلچراغ[1] می باشد که پتانسیل بسیار بالایی را به عنوان یک گل جدید و مناسب برای عرضه

[1] Liliaceae



به بازار گل ایران و جهان داراست. این گل بسیار زیبا از جمله گل های پیازی بوده و دارای خصوصیات مناسبی چون بلند بودن ساقه گل دهنده، دوام مناسب گل، و ظاهری شگفت انگیز می باشد (قهرمان، ۱۳۷۰).

در سالهای اخیر علاقه مصرف کنندگان به شکل های جدید و رنگ های متنوع افزایش پیدا کرده و همین امر سبب افزایش تقاضا ی گلهای پیازی شده است. لیلیوم ها یکی از شش جنس عمده گلهای پیازی هستند که در جهان تولید می شوند. به طور کلی لیلیوم ۱۲٪ سطح کل زیر کشت و چهارمین گل پیازی مهم پس از لاله، گلایل، و نرگس در آمریکا است و هر ساله تعداد زیادی ارقام و هیبریدهای مختلف آن توسط بهنژادگران گیاهی تولید می گردد (معمار مشرفی و همکاران، ۱۳۸۳).

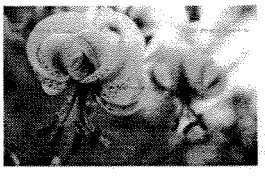
در حال حاضر سه بازار اصلی لیلیوم ها عبارتند از:

- گلهای بریدنی[2]
- گلهای گلدانی[3]
- باغها و فضای سبز

کلید اصلی بازاریابی موفق لیلیوم در آینده، استفاده از اصلاح ژنتیک و انتخاب انواع و ارقام جدید است (De Hortogh, 1996).

در جدول زیر (Harper, 1991) میزان تولید گلهای پیازی در کشور هلند به عنوان مهمترین صادر کننده گلهای پیازی جهان در یک فاصله کوتاه چند ساله فقط برای مقایسه آورده شده

[1] Lilium *ledebourii* (Baker) Boiss
[2] Cut flowers
[3] Pot Flowers



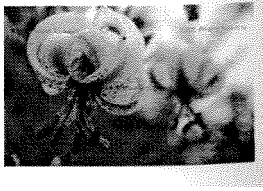
است. همانطوریکه در جدول ذیل مشخص است سطح زیر کشت لیلیوم که در سال ۱۹۸۰ در رتبه چهارم قرار گرفته بود، در سال ۱۹۸۸ به رتبه دوم افزایش یافته است.

جدول ۱-۱ : تولید گلهای پیازی در هلند (برحسب میلیون گیاه)

نام گیاه	سال ۱۹۸۰	سال ۱۹۸۸
لاله	۶۰۸۶	۷۳۸۹
لیلیوم	۱۱۱۹	۲۱۹۲
گلایل	۱۹۰۲	۲۱۱۴
نرگس	۱۵۲۳	۱۶۵۸
سنبل	۸۲۶	۱۰۵۹
زنبق	۹۵۲	۹۱۶
زعفران	۳۹۸	۴۵۱
غیره	۵۳۵	۶۱۱
کل	۱۳۳۴۲	۱۶۴۲۸

با توجه به پتانسیل اقتصادی این جنس در میان گلهای پیازی و ارزش اقتصادی بالای آن، از تنها گونه لیلیوم که در ایران به صورت خودرو می روید یعنی سوسن زیبای چلچراغ، می توان برای استفاده در صنعت گلکاری سود برد.

به منظور اهلی کردن و معرفی کردن گیاهان بومی خودرو و جدید به صنعت گلکاری، مراحل مختلفی باید صورت بگیرد، که یکی از مهمترین این مراحل، بررسی روش های تکثیر و ارزشیابی



عملیات باغبانی مورد نیاز می باشد. به طور کلی گیاهان جدید را می توان به صورتهای زیر تعریف کرد:

۱.جنس ها و گونه های گیاهی که جدیداً کشف می شوند.

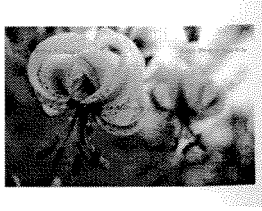
۲.ارقام جدید گیاهی که از سالها قبل می روئیده اند ولی اطلاعات کامل کشت و کار آنها فراموش شده یا اطلاعات کافی در این زمینه نیست.

۳.گیاهانی که در کشورهای دیگر می رویند اما هنوز به ایران معرفی نشده اند.

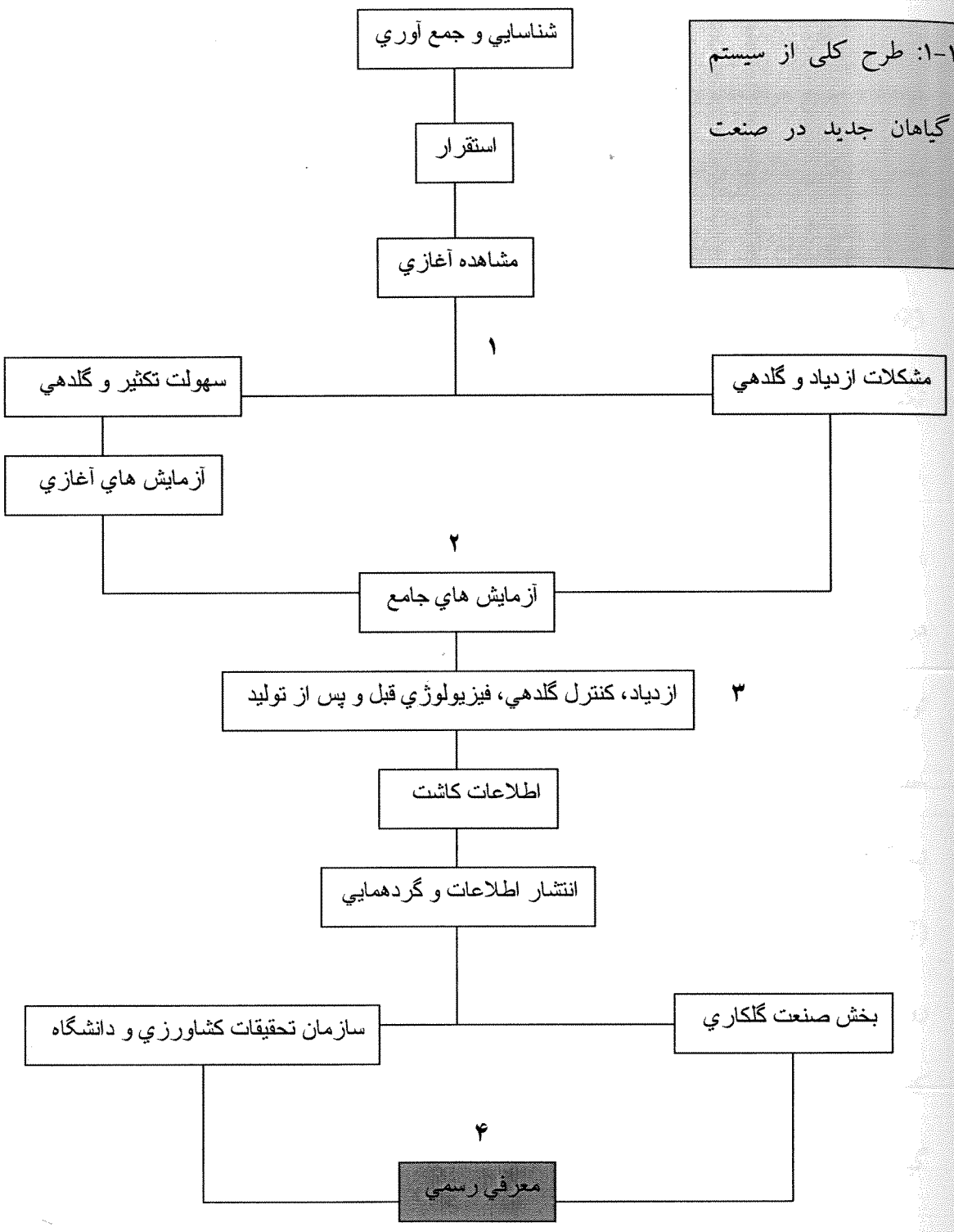
۴.گیاهانی که توسط فن آوری های جدید تولید شده اند و باعث افزایش کیفیت محصول و کوتاهتر شدن کل دوره تولید می گردند (Halvey, 2000).

همانطور که ذکر شد پس از جمع آوری گونه های جدید، اولین قدم در انجام آزمایشات و بررسی های اولیه، شناسایی روش های تکثیر آن گیاه می باشد. در طی تکثیر و رشد و نمو اولیه گیاه، سرعت، سادگی، و نرخ تکثیر[1]، به همراه وضعیت گیاه مورد بررسی و ارزشیابی قرار می گیرد. در نمودار ۱-۱ چارچوبی فراگیر از سیستم ارزشیابی گیاهان جدید برای صنعت گلکاری آورده شده است (Roh and Lawson, 1993).

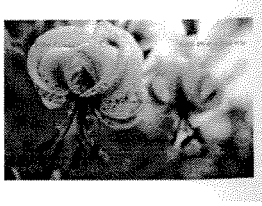
[1] Propagation rate



نمودار ۱-۱: طرح کلی از سیستم ارزیابی گیاهان جدید در صنعت گلکاری



اعداد ۱ تا ۴ به ترتیب نشان دهنده اولین تا چهارمین مرحله قضاوت و تصمیم برای حذف گیاه مورد نظر بر حسب اطلاعات به دست آمده تا آن زمان می باشد.



به علت سرعت آهسته ای که سیستم های طبیعی تکثیر دارند و همچنین احتمال آلودگی مجدد و سریع مواد مادری، سیستم های تکثیر مؤثر و سریع مورد نیاز می باشد. تکثیر جنسی اغلب منجر به تکثیر مطلوب و خالص گونه نمی شود و گیاهان بذری تولید شده نسبت به والدینشان متفاوت هستند. برای رفع این مشکل از روش های تکثیر غیر جنسی یا رویشی[1] استفاده می شود(De Hortogh, 1993).

تکثیر غیر جنسی تجاری در گیاهان پیازی به خصوص جنس لیلیوم به دو صورت انجام می شود:

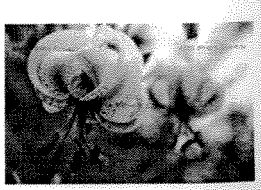
- تکنیک فلس برداری[2]
- تکنیک کشت بافت[3]

در روش فلس برداری تک تک فلس ها از پیاز مادری جدا شده و تحت شرایط مناسب رشد به منظور تولید پیازچه های نا به جا قرار می گیرند. از آنجائیکه تیمار کردن[4] با تنظیم کننده های رشد[5] به خصوص اکسین های برون زا[6] بر میزان پیازدهی مؤثر می باشد، بدین منظور این تکنیک همواره با تیمار[7] تنظیم کننده های رشد برای بالا بردن بهره وری تکثیر انجام می گیرد (Hartmann *et al.* , 1997).

روش دیگر تکثیر که امروزه نقش مهمی در تولیدات باغبانی به خصوص در تکثیر گیاهان زینتی دارد کاربرد تکنیک کشت بافت است، به طوریکه برخی از آزمایشگاههای تجاری توانایی تولید ۲۰۰/۰۰۰ گیاهچه[8] درون شیشه ای[9] را طی یک هفته دارند (Thorpe and Harry, 1996).

---

[1] Vegetative propagation
[2] Scaling
[3] Tissue culturing
[4] Treating
[5] Growth hormons
[6] Exogenous auxins
[7] Treatment
[8] Plantlet
[9] In vitro



در تحقیق حاضر، ما بر روی روش دوم تکثیر تمرکز کرده و قصد داریم تا با استفاده از تکنیک کشت بافت به یک دستوالعمل مناسب برای تکثیر انبوه تعدادی از انواع گل زینتی لیلیوم دست یابیم و نهایتاً با به کار بستن تجربیات به دست آمده تمام تلاش خود را برای تکثیر گونه لیلیوم بسیار کمیاب و در حال انقراض سوسن چلچراغ نمائیم.

گرچه این گل به دلیل اینکه جزو میراث ملی محسوب می شود، در بین گیاهان ژرم پلاسم[1] ایران از اهمیت بسیار بالایی برخودار می باشد ولی از آنجائیکه منطقه رویش آن بسیار محدود می باشد (فقط حدود ۶۰۰۰ متر در ارتفاعات داماش در شهرستان رودبار که دور آن نیز کاملاً حصار کشی شده و به شدت محافظت می شود) و مسیری صعب العبور دارد که فقط در زمانی از سال که شرایط جوی مناسب باشد قابل رفت و آمد است، دسترسی به این گل مشکل می باشد. از آن مهم تر مشکلات و موانع عدیده ای است که دستگاه های دولتی ذیربط من جمله سازمان محیط زیست کل کشور و استان گیلان و منابع طبیعی در مسیر تهیه نمونه مورد نیاز ایجاد می کنند که واقعاً ذوق محقق را برای تحقیق روی این نمونه کاملاً سرکوب می کند. به نظر می آید همه دلایل مذکور باعث شده که تحقیقات علمی بر روی این نمونه ارزشمند به صورت بسیار محدود و انگشت شمار انجام شده باشد.

به طور کلی فرضیه های پژوهش حاضر عبارتند از :

- تکثیر گل سوسن چلچراغ از طریق تکنیک کشت بافت امکان پذیر است.
- پیاز دهی سوسن چلچراغ تحت تأثیر غلظت ها ی مختلف تنظیم کننده های رشد است.
- موفقیت در پژوهش فوق می تواند سبب گشودن راهی برای جلوگیری از انقراض این گل زیبا و منحصر به فرد گردیده و امکان افزودن این گیاه به عنوان یک گل جدید به لیست گل های

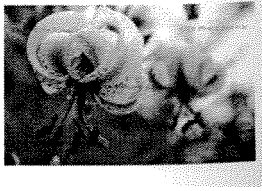
[1] Germplasm



بریده و صادرات آن را موجب گردد. همچنین از طریق کاشت و پرورش این گل، ایجاد جاذبه های اکوتوریستی شده و سبب اشتغال زایی گردد.

اهداف

- پیدا کردن یک روش ضدعفونی سطحی مناسب برای ریزنمونه ها
- بررسی تأثیر غلظت مختلف هورمون های رشد اکسین و سایتوکینین بر میزان کالوس زایی و همچنین میزان باززایی جوانه ها (پیازچه ها) از ریزنمونه های کشت شده بر روی محیط MS
- پیدا کردن غلطت مناسب از یک هورمون ریشه زا در محیط ریشه زایی
- پیدا کردن زمان مناسب برای انتقال گیاهچه های ریشه دار شده به خاک و همچنین دست یابی به شرایط مناسب به جهت سازگار کردن تدریجی آنها با محیط خارج از لوله آزمایش و نهایتاً انتقال آنها به گلخانه



فصل دوم

مروری بر منابع

۲,۱. گل لیلیوم

لغت لیلیوم شکل لاتین یونانی *leirion* است (Pollock and Griffiths ,1998). li به معنای سفیدی است و احتمالاً منظور لیلیوم مدونا[1] - که در ایران به آن لیس[2] گفته می شود بوده است . لیلیوم مظهر پاکدامنی، معصومیت ، نجابت و خلوص می باشد . نه گل رز ونه میخک هیچکدام تنوع و درخشش رنگهای شادی بخش لیلیوم را ندارند (Feldmaier,1979).

می گویند سوسن (لیلیوم) جواب سلامی است به خورشید و این نه فقط زیباترین جواب سلام بلکه نهایت سپاس از خورشید است. نوع سفید آن، که به ده زبان معروف است، در آزادی و آزادگی به ناهید بانوی آب ها مربوط بوده و از نشانه های مخصوص ناهید می باشد . در کتاب زبور[3] حضرت داوود ، از سوسن به عنوان نغمه و نوایی از موسیقی و خنیاگری و نوازندگی یاد شده است که این خصوصیات ارتباط آن را با ناهید ، خنیاگر فلک، محکمتر می کند .

سوسن در دین و هنر نشانه پاکی است . شاید به همین خاطر است که چشم پوشی از تصاویر خیال انگیز بر گرفته از سوسن در ادب پارسی غیر ممکن است . برخی از شعرای بنام از جمله سنایی، حافظ و خاقانی در اشعارشان از سوسن یاد کرده اند (شکرایی،۱۳۷۹) :

اگر رفعت همی جویی سیه دل باش چون لاله ور آزادی همی خواهی زبان ده دار چون سوسن

(سنایی، قرن پنجم)

زمرغ صبح ندانم که سوسن آزاد چه گوش کرد با ده زبان خموش آمد

(حافظ، قرن هشتم)

نه به یاران کمربندم چو غنچه نه بر خصمان سنان سازم چو سوسن

(خاقانی، قرن نهم)

---

[1] *Lilium candidum*
[2] Liss
[3] Book of Psalms



با آثاری که از این گیاه گلدار بر روی ظروف سفالین در ناحیه ای از کرت بنام کنوس[1] به دست آمده است ، قدمت شناسایی گیاه به ۱۷ قرن قبل از میلاد مسیح نسبت داده شده است؛ درحدود ۱۰۰ سال بعد از تاریخ مذکور نیز پرورش آن احتمالاً معمول گشته است (زرگری،۱۳۷۲). در مومیائیهای مصری نیز پیاز لیلیوم دیده شده است همچنین از آن در تورات نیز نامبرده شده است (Feldmaier,1979).

۲,۲. گیاهشناسی تیره لیلیاسه[2]

از نظر گلکاری تیره لیلیاسه یکی از مهمترین تیره های تمامی سلسله گیاهی است ، زیرا تعداد زیادی از گیاهان که در گلکاری کشت و پرورششان متداول است جزء این تیره محسوب می شوند . گیاهان این تیره ، دارای پیاز دائمی بوده ، پیازها با قابهایی پوشیده شده اند ، دارای ساقه ای غیر منشعب ، بدون کرک یاکرک دارند و معمولاً به رنگ سبز روشن و در بعضی انواع بنفش و قهوه اینـد . تمامی طول ساقه پوشیده از برگهایی است به رنگ سبز روشن که غالباً بدون دمبرگ می باشند . پریانت[3] (قسمت های بیرونی غیر زایشی یک گل که غالباً به صورت کاسه و جام گل متمایز می شوند) شامل ۶ گلبرگ است که به صورت دو حلقه سه تایی آرایش یافته اند . اندام نر شامل ۶ پرچم که به صورت ۲ حلقه ۳ تایی قرار می گیرند . میوه آن کپسول است . این تیره از تیره های بزرگ گیاهی محسوب می گردد که شامل ۲۵۴ جنس و بیش از ۴۰۰۰ گونه است که در سرتاسر گیتی پراکنده شده اند (Bendre and Pande ,2000).

[1] Knosse
[2] Liliaceae
[3] Perianth



برخی از گیاهان این تیره اهمیت اقتصادی زیادی دارند. مارچوبه[1] و گونه های متنوع آلیوم که نزد سیفی کاران با نامهای تره، موسیر، پیازچه، و سیر شهرت دارند، به عنوان ماده غذایی یا چاشنی کشت و زرع می شوند، در صورتیکه صبر زرد[2]، پیاز عنصل[3]، و *وراترروم*[4] دارای ارزش دارویی می باشند. پیاز گل حسرت[5] که آلکالوئید کلشی سین از آن استخراج می شود نیز در کارهای بهنژادی سبب پلی پلوئیدی سلول می گردد. در مقابل گونه های زیادی از این تیره فقط جنبه تزینی داشته و غالباً در باغچه ها کاشته می شوند (Hichey and King, 1930).

بطور کلی از نظر شکل گل و برگها می توان گیاهان این تیره را به صورت زیر دسته بندی کرد.

-گیاهانی که گلهای آنها شبیه به لیلیوم معمولی است.

-گیاهانی که گلهای آنها به صورت زنگوله است.

- گیاهانی که گلهای آنهابه صورت منفرد است.

- گیاهانی که گلهای آنهاسربالا و مستقیم است.

-گیاهانی که دارای برگهای قلبی شکل هستند.

-گیاهانی که شبیه به لاله واژگون هستند (خلیقی،۱۳۷۶).



شکل ۱- ۲ : نمونه ای از یک گل لیلیوم و پیاز آن (Wallich's lily)

[1] Asparagus *officinalis*
[2] Aloe
[3] Urginea
[4] Veratrum
[5] Colcicum *autumnals*



۲،۲،۱. پراکنش و گیاهشناسی جنس لیلیوم

امروزه بیش از ۱۲۰ گونه یا بیشتر از جنس لیلیوم در جهان گزارش شده است . (Maesato et al.,1994). پراکنش این جنس در نیمکره شمالی از دشتها و مناطق کوهستانی شمال اروپا تا جنوب آسیا و آمریکای شمالی کشیده شده است. در این جنس تعداد بیشماری ارقام دورگه به وجود آمده است . در برخی از ارقام لیلیوم ریشه ها در روی ساقه درست بالای پیاز توسعه پیدا کرده اند. ساقه ها غیر منشعب و معمولاً طویل و قائم هستند بطوریکه در برخی گونه ها تا سه متر نیز ذکر گردیده است . برگها بیضوی، سر نیزه ای یا خطی ، برخی گلها بسیار خوشبو بوده به صورت منفرد یا خوشه ای با گل آذین چتری یا خوشه ای می باشندکه بعداً تبدیل به میوه شده و تشکیل کپسول هایی را می دهند که حاوی بذور تخت ، سبک و نازک هستند . جنسهای این تیره توسط خصوصیات زیر شناخته می شوند :

الف _ فلسها به صورت جدا از هم روی یکدیگر را پوشانده اند و در انتها در یک نقطه مانند پیاز به یکدیگر می رسند .

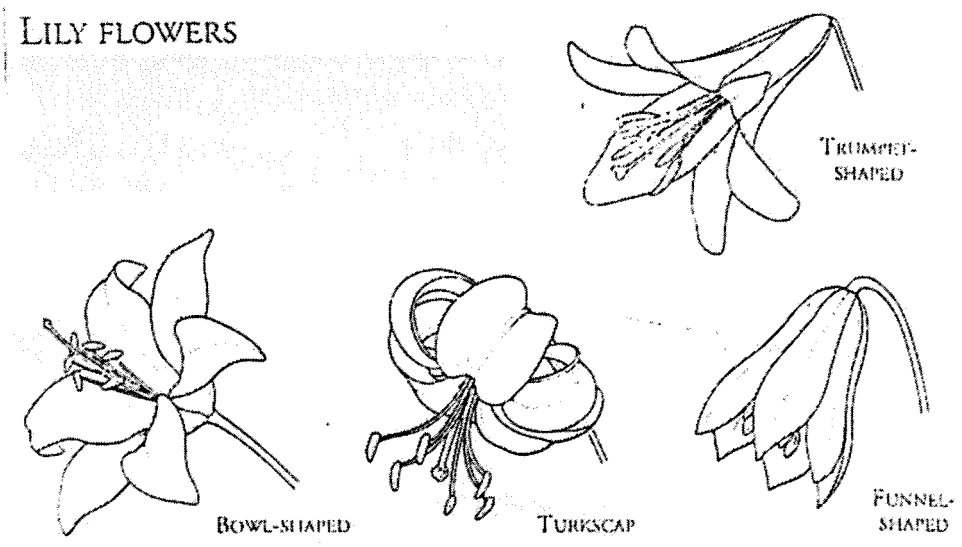
ب _ برگها قلبی شکل نبوده بلکه کشیده و موازیند و به صورت مسطح قرار گرفته اند .

ج- گل آذین ها دارای چند گل بوده که بر روی دمگل بلندی ظاهر می شوند و براکته هایی که به ساقه اصلی متصلند آنها را در بر می گیرد .

د- غلاف بذر یک کپسول است که از سمت بالا باز می شود و در هر برچه سه بذر وجود دارد که تخت و سبک بوده و توسط باد پراکنده می شوند (Feldmaier,1979).

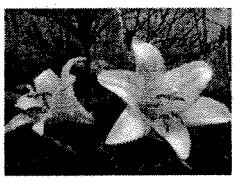


هر گل دارای شش پرچم و شش گلبرگ است و گلها به اغلب رنگها مانند سفید، زرد، صورتی، نارنجی، گلبهی و ... دیده می شوند . در اطلس های گیاهشناسی گلها به ۳ اندازه کوچک، متوسط، و بزرگ دسته بندی شده اند. در گلهای به شکل کلاه ترکی ، جامی و ستاره ای، گلهای به قطر cm ۵ کوچک، بین ۵ تا cm ۷ متوسط، و از cm ۷ بیشتر در گروه بزرگ دسته بندی می شوند . برای اشکال شیپوری و قیفی گلهای کمتر از cm ۷ کوچک، بین ۷ تا cm ۱۰ متوسط، و از cm 10 بیشتر بزرگ نامیده می شوند . گلها ممکن است به صورت افقی ، آویزان و .... باشند همچنین شکل گلها می تواند به صورت جامی[1]، کلاه ترکی[2]، قیفی[3] یا شیپوری[4] باشد .



شکل ۲-۲ : انواع گل در جنس لیلیوم (Brickell,1996)

[1] Bowl shaped
[2] Turk's cap
[3] Funnel
[4] Trumpet



۲,۳. گیاهشناسی و پراکنش گل سوسن چلچراغ

زمانیکه چلچراغ آسمان خاموش می شود و خورشید با لبخند همیشگی زوال شب و زیبائیهایش را به صخره می گیرد و سرمست از پیروزی به امحاء آثارش می پردازد ، یادگاری زیرکانه از شب بر جای می ماند؛ آنقدر زیرکانه که خورشید اسیر حیله ی شب شده و خود موجب تجلی بیشترش می گردد و چنان وفادار به شب که روی به خورشید نمی نماید بلکه روی به زمین دارد . سوسن چلچراغ قندیل زیبائیست که هر چشمی را به بازی می گیرد .

نام علمی آن *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss بوده که مترادف آن *Lilium monodelphum* var. *ledebourii* Baker است. دارای پیاز تخم مرغی یا کروی شکل پوشیده از فلس های زرد و سرنیزه ای شکل، به علاوه ساقه بلند و قوی به ارتفاع ۱۵۰-۵۰ cm است که در تمام طول آن پوشیده از برگهای متراکم ایستاده و در بخش فوقانی تقریباً کم برگ می باشد؛ برگهای ایستاده، خطی، سر نیزه ای به ابعاد ۱۵-۱۰ cm و عرض ۲-۱ cm، نوک تیز، سبز تیره تقریباً دارای ۷ رگبرگ، سطح زیرین و روی رگبرگها پرزپوش ولی در حاشیه کم و بیش پوشیده از مژک، برگهای بالایی ساقه کوچکتر از بقیه، گلها غالباً خود گرده افشان و سفید و بزرگ، مجتمع در خوشه های دارای ۱۵-۲ گل با دمگل هایی به طول تا ۱۳ cm، گسترده یا کمی برگشته، براکته ها سر نیزه ای ودر انتها تقریباً آبی رنگ، گلپوش در بخش فوقانی سفید ودر پائین سبز مایل به زرد دارای نقاط ارغوانی با تقسیماتی به ابعاد ۱۴ mm - ۱۰×۸۰ ، سر نیزه ای به طرف قاعده باریک شده، بلند و داسی شکل بدون کرک، بساکها قرمز مایل به زرد، نوشجانی فاقد مژک، میوه کپسول ایستاده به بزرگی ۳۲-۲۵×۴۵-۳۰ mm، واژ تخم مرغی، دارای ۶ زاویه کند، زمان رسیدن بذر مرداد یا شهریور، جوانه زنی بذر کند، موسم گلدهی از اواخر خرداد تا اواسط تیر ماه، انتشار جغرافیایی: شمال؛ رودبار وکلاردشت در استان مازندران، استان گیلان، عمارلو(داماش) و استان لنکران در کشور



آذربایجان (قهرمان ، ۱۳۷۰؛ Rechinger,1990; Komarov,1968) . اخیراگزارشاتی مبنی بر دیده شدن این گونه در کشورهای حوزه دریایی بالتیک مثل لیتوانی و استونی واصل گردیده است (Mynett,1996).

رویشگاه این گیاه نادر ارزشمند در سال ۱۳۵۴ در ارتفاعات داماش از توابع عمارلوی شهرستان رودبار توسط دانشمند فرانسوی به نام کارل فردریش لدبوری[1] شناسایی گردید وبه خاطر بزرگداشت این دانشمند نام وی بر روی این گونه گذارده شد. سوسن چلچراغ طی مصوبه ۷۱ شورای عالی محیط زیست در تاریخ ۱۳۵۵/۵/۶ جزء آثار ملی طبیعی کشورمان به ثبت رسید. آثار ملی طبیعی، آثار طبیعی هستند که نادر یا کمیاب بوده و در واقع سمبل آثار طبیعی هر کشوری محسوب می گردند. (کشور ما کلاً دارای شش اثر ملی طبیعی است که از آن جمله می توان به معبد چغار زنبیل در شوش، چشمه قیر در ایلام، سوسن چلچراغ در منطقه ی داماش شهرستان رودبار و... اشاره کرد.) اگرچه بیکر[2] آنرا واریته ای از گونه *L. monadelphum* تلقی کرده بود ولی به نظر می رسد احتمالاً از بقایای لیلیوم های اروپایی چون گونه *L. pyranaicum* بوده و ارتباط زیادی با آن دارد و نزدیکترین گونه به آن در نظر گرفته شده است، تلاقی آن با *L. candidum* به احتمال زیاد امکان پذیر می باشد (Hubert,1957 ;Feldmaier,1979) .

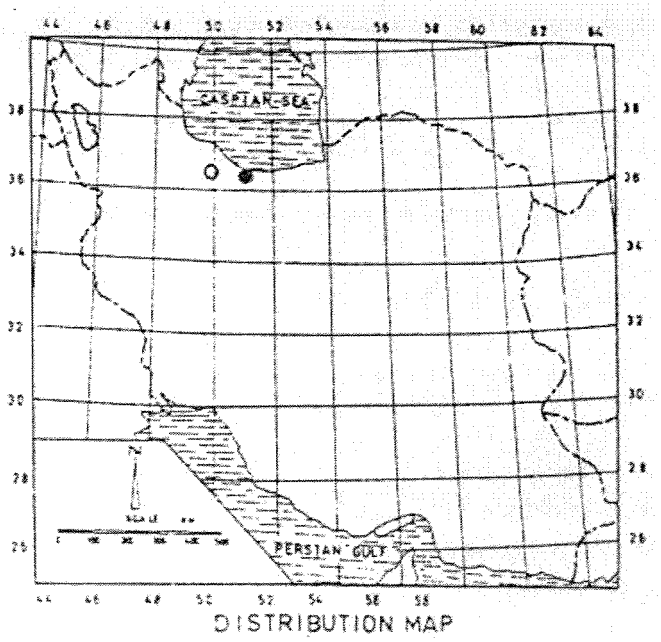
گیاهان تیره لیلیاسه به همراه اغلب تیره های گیاهی شمال البرز متعلق به دوره ی ترشیاری[3] بوده اند که طی این دوره زمین شناسی آب و هوای جهان مرطوب و ملایم بوده است و گیاهان مزوفیتیک استقرار پیدا کرده اند . پس از دوره ی کواترنری[4] برخی از گیاهان چون انواع سرو ، تویا، تاگزوس و.... بر اثر حرکات کوه زایی در بین دره ها و کوههای البرز محدود شدند . این پراکنده

---

[1] Karl Friedrich lede bourii(1781-1851)
[2] Baker
[3] Tertiary
[4] Quaternary



شدن سبب توزیع گونه های پیازی چون لاله ، زعفران ، زنبق و لیلیوم گردید و این گونه ها می توانند به علت چنین وقایعی به صورت جداگانه قرار گرفته باشند (Ala,1974).



شکل ۳-۲ : پراکنش این گیاه را در کشور ایران نشان می دهد .

هم در منطقه ی داماش و هم در منطقه رویشش در دامنه های شمالی کوههای درفک از توابع شهرستان رودبار، حداکثر دو هفته پس از آب شدن برفها این گیاه سر از خاک بیرون می آورد و از اواخر خرداد تا اوایل تیرماه این گیاه شروع به گلدهی در منطقه می کند وزمان گلدهی آن به ابری یا آفتابی بودن هوا طی این مدت بستگی دارد به طوریکه هر چه هوا ابری تر باشد زمان گلدهی آن تا اوایل تیر ماه به تأخیر می افتد.گلبرگها حداکثر تا ۱۵ روز باقی مانده و سپس می ریزند و در این زمان است که بذر در داخل کپسول نمایان می گردد.

در اوایل مرداد ماه برگهای گیاه نیز می ریزند ولی ساقه گیاه هنوز سبز باقی می ماند و در شهریور ماه بذر در داخل کپسول رسیده و ساقه شروع به خشک شدن می کند . از آنجائیکه قبل از شروع رویش سرخسها فصل رویش این گیاه شروع می شود بنابراین این دو گیاه در اوایل فصل رویش



بر سر نور به رقابت نمی پردازند . به دلیل بلند تر بودن این گیاه نسبت به سایر گیاهان علفی همراه و همچنین رنگ زرد مشخص و بوی خاص آن ، شدیداً مورد علاقه ی بزها می باشد . همچنین مشاهده گردیده که این گیاه در قسمتهای دارای نور، گسترده شده و تراکمش نسبت به مناطق کاملاً سایه بیشتر می گردد. به طوریکه در مناطق صخره ای و کم عمق ساقه کوتاه و به طور متوسط cm ۶۰-۴۵ می باشد در صورتیکه در مناطق دارای خاک عمیق و کف شیارها تا ارتفاع cm ۱۶۱ نیز دیده و اندازگیری شده است و به طور کلی این گیاه در منطقه ی عمارلو (از توابع شهرستان رودبار در گیلان) در دو منطقه جدا از هم می روید (کاظمی و صابر ی،۱۳۷۷) .

۲,۳,۱. منطقه ی رویش داماش

در این منطقه ، گیاه توسط سازمان محیط زیست حفاظت شده و در اطراف آن توری فلزی به مساحت حدود ۲ هکتار کشیده شده است . منطقه داماش عمارلو در طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۴۸ دقیقه ('۴۸و °۴۹) و عرض جغرافیایی '۴۴ و °۳۶ دقیقه واقع است . ارتفاع این منطقه در ۱۷۵۰ متری از سطح دریا و فشار هوا در آنجا mbar ۸۳۸ می باشد . پوشش گیاهی منطقه ی داماش شامل گیاهان کف پوش منطقه چون آقطی،چاودار، گل بنفشه جنگلی، دم اسب، و تمشک است . از درختان و درخچه های این منطقه می توان نسترن وحشی سفید ، سرخ ولیک ، ازگیل وحشی ، راش و بلوط را نام برد. سوسن چلچراغ گیاهی نسبتاً سایه دوست است و وجود گیاهان کف پوش و درخچه ها، گیاه را احاطه کرده و مانع خوبی برای جلوگیری از تبخیر شدید و خشکی خاک هستند . از جانوران منطقه نیز می توان گراز ، خارپشت ، روباه ، خرس قهوه ای راسو ، بلدرچین و کبک را نام برد . از ملاحظه آثار و علائم چنین بر می آید که گرازها علاقه ویژه ای به خوردن پیاز سوسن چلچراغ دارند (کاظمی و صابر ی؛۱۳۷۷).



۲,۳,۲. منطقه رویش درفک

این رویشگاه که حدوداً در ۲۰ کیلومتری منطقه ی داماش واقع می باشد از کش کوه در شهرستان سیاهکل شروع شده و کل دامنه ی شمالی درفک را در بر می گیرد و به "لبی کنار" در جنوب غربی درفک در شهرستان رودبار خاتمه می یابد . ارتفاع این رویشگاه از ۱۶۰۰ متری ارتفاع از سطح دریا در کش کوه شروع شده و در منطقه سردین به ارتفاع ۲۵۰۰ متری می رسد . به طور متوسط طول این رویشگاه ۳۰۰۰ متر و عرض آن در حدود ۳۰۰m می باشد که در سرتاسر منطقه به صورت کمربندی که بالای آن سرخدارها و در پائین آن زیستگاه کبک دری می باشد پراکنده شده است . از خصوصیات این کمربند مه گیر بودن آن در عصرهای اکثر روزهای بهار و تابستان می باشد . از مناطق این رویشگاه که گیاه سوسن چلچراغ به فراوانی در آنجا دیده شده است می توان به "ورزاکت" ،" قلعه شیخ سرا"، "اشتنف"، "سردین بن" و "لبی کنار" اشاره کرد پوشش گیاهی منطقه شمال درفک عبارتند از گیاهان کف پوش منطقه چون کلاغک ، گل استکانی ، سرخس، گل صدتومانی و از درخچه ها و درختان آن می توان به جل ، سرخ ولیک ، خاس ، نسترن وحشی و گونه های درختی چون راش ، نمدار، ممرز، افرا و بارانک اشاره کرد لازم به ذکر است که در اطراف اشتانف گل سوسن چلچراغ بایکی از گیاهان با ارزش کشورمان یعنی زیره کوهی همراه است (کاظمی و صابر ی؛۱۳۷۷) .

۲,۴. طبقه بندی جنس لیلیوم

دسته اول : هیبریدهای آسیایی[1]

این لیلیوم ها از گونه های مختلف آسیایی حاصل شده اند مثل: *L. maculatum* ؛ *L. pumilum* ؛ *L. bulbiferum* ؛ *L. amabile* ؛ *L cernuum* ؛ *L davidii* ؛ *L xhollandicum*

[1] Asiatic hybrids



L. Iancifolium ؛ گلها به صورت گل آذین خوشه ای[1] یا چتری[2] ظاهر می شوند واغلب فاقد عطر هستند، برگها باریک، بیضی شکل و آرایش متناوب دارند و به ۳ بخش زیر تقسیم می شوند:

الف)لیلیوم های زود گل با گلهای قائم[3] منفرد یا به صورت گل آذین چتر

ب)گلهای با گلبرگ برگشته

ج)گلهای آویزان[4]

دسته دوم : هیبریدهای مارتاگون[5]

اغلب از گونه های *L. martagon* یا *L. hansonii* بدست آمده اند . این لیلیوم ها تولید گل آذین خوشه یا گلهای دارای گلبرگ برگشته به شکل کلاه ترکی می کنند ،گاهی اوقات دارای رایحه هستند. برگها فراهم[6] یا بیضی[7] شکلند . سوسن چلچراغ را از دسته لیلیوم های مارتاگون دانسته اند (Hubert,1957).

دسته سوم : هیبریدهای کاندیدم[8]

این دسته عمدتاً از گونه های *L. candidum* یا *L. chalecdonicum* و سایر گونه های اروپایی به جز *L. martagon* حاصل شده اند . این لیلیوم ها گاهی معطرند ، اغلب به شکل کلاه ترکی دارای گل آذین منفرد، چتری یا خوشه ایند. برگها بیضی شکل با آرایش مارپیچی یا پراکنده هستند .

دسته چهارم : هیبریدهای آمریکایی

از گونه های آمریکایی حاصل شده اند؛ این لیلیوم ها دارای گل آذین خوشه ای هستند، اغلب به شکل

---

[1] Racemes
[2] Umbel
[3] Upright
[4] Pendent
[5] Martagon
[6] Whorls
[7] Elliptic
[8] Candidum



کلاه ترکی، گاهی اوقات زنگوله ای، برگها فراهم و بیضی شکل گاهی نیزه ای شکلند، برخی از آنها معطرند.

دسته پنجم : هیبریدهای لیلیوم عید پاک

این دسته از گونه های *L. longiflorum* یا *L. formosanum* حاصل شده اند. لیلیوم های این دسته دارای گل آذین خوشه یا چتری بزرگ هستند. اغلب دارای رایحه ای دل انگیز می باشند. گلها به شکل شیپوری یا زنگوله ای بوده در برخی گونه ها ۲ تا ۳ گل در هر ساقه وجود دارد. برگها خطی تا نیزه ای باریک و پراکنده هستند.

دسته ششم : هیبریدهای شیپوری و اورلین[1]

از گونه های آسیایی چون *L. regale* ؛ *L. henryi* ؛ *L. sargentia* و به جز گونه های *L. speciosum* و *L. japonicum* به دست آمده اند. این لیلیوم ها دارای گل آذین خوشه یا چتر بوده و معمولاًمعطر هستند. برگها بیضوی تا خطی و متناوب با آرایش مارپیچی هستند و به ۴ بخش زیر تقسیم می گردند:

الف) گلهای شیپوری شکل

ب) گلهای فنجانی شکل با محور افقی

ج) گلهایی که به میزان بسیار کمی فنجانی شکل هستند و تقریباً صاف و تخت می باشند.

د) گلهای با گلبرگ های کاملاً برگشته

[1] Aurelian



دسته هفتم : هیبریدهای شرقی[1]

از گونه های شرق آسیا چون *L.auratum*؛ *L. japonicum*؛ *L. speciosum* به علاوه هیبریدهای با گونه *L.henryi* به دست آمده اند. گلها بر روی گل آذین به صورت خوشه ظاهر می شوند و اغلب معطرند. برگها باریک و نیزه ای شکل و متناوبند. این دسته به ۴ بخش زیر تقسیم می گردند:

الف)گلهای شیپوری شکل

ب)گلهای فنجانی شکل

ج)گلهای صاف و تخت

د) گلهای کلاه ترکی یا گلهای با گلبرگ برگشته به سمت دمگل

دسته هشتم : کلیه دو رگهایی که در هیچ دسته دیگری نیامده اند .

دسته نهم : کلیه گونه های حقیقی[2] با واریته ها و فرمهایشان (Brickell,1996 ; Millidge,1999)

۲,۵. ترکیبات شیمیایی و خواص درمانی لیلیوم

نشاسته مهمترین پلی ساکارید ذخیره ای در پیازهای لیلیوم می باشد و بعد از آن گلوکومانان[3] قراردارد در برخی کشورها مثل چین از پیازهای آن آرد تهیه شده و به مصرف خوراکی نیز می رسد . در گونه لیلیوم عید پاک ۸۵٪ پلی ساکاریدهای ذخیره ای را نشاسته و ۱۵٪ باقیمانده را اغلب

[1] Oriental
[2] All true species
[3] Glucomannam



گلوکامانان تشکیل می دهد (Kim *et al* .,1994) . بررسی های روتلر[1] وجود ماده ای به نام سیلین را که نوعی آلکالوئید است در پیازهای این گونه مشخص کرده است (زرگری،۱۳۷۲) .

از گونه *L. pyranaicum* با استفاده از خیساندن پیازهای این گونه در الکل نوعی گلیسیروگلیکوزیدهایی[2] بدست آمده است که در طب سنتی اسپانیا به منظور خاصیت ضد التهابی کاربرد دارد . در کتابهای قدیمی گیاهان دارویی چون [Hieronymus Bock's Book ; 1547] توصیه شده است که خیسانده گلها و پیازهای لیلیوم سبب بهبودی روح شده و ناراحتی های کبد و دردهای مزمن را درمان می کند . همچنین اسانس استخراج شده از پیاز به منظور رفع التهاب ، سوختگی و برطرف کردن واریس استفاده می گردیده است . همچنین در این کتاب ذکر شده که خاکستر پیازهای لیلیوم به همراه عسل سبب معالجه کچلی پوست سر می گردد(Feldmaier,1979).

در گذشته پیاز لیلیوم به عنوان مدر و خلط آور و در استعمال خارجی به عنوان نرم کننده و به صورت ضماد مورد استفاده قرار می گرفته است . از پیاز لیلیوم بیشتر به حالت پخته در زیر خاکستر یا در آب جوش یا شیر و یا له شده آن به صورت پماد یا ضماد نرم کننده جهت رفع التهاب و تومورها استفاده به عمل می آید . همچنین ضماد و پماد آن برای درمان سرمازدگی ، زخمهای ملتهب و سوختگیها کاربرد دارد . پیاز لیلیوم دارای موسیلاژ فراوان بوده و در رفع ناراحتی های پوستی تأثیر دارد.

گلبرگهای لیلیوم اختصاصاتی شبیه به پیاز دارد و ازآنها به صورت زیر استفاده می شود :

۱. خیسانده گلبرگ لیلیوم در الکل که دارویی التیام بخش است و با تأثیر بر روی بریدگیهای پوست بدن یا زخمهای تازه و سطحی موجب التیام سریع آن می شود .

---

[1] Reutler
[2] Glyceroglycosides



۲. با خیساندن گلبرگها در دوبرابر حجم خود درون روغن زیتون دارویی بدست می آید که به سهولت شکافهای نوک پستان و سوختگیهای عادی را درمان می کند .

با وارد کردن قطعات گل در روغن و تبخیر آن به حدی که رطوبت آنها از بین برود ، روغنی به نام "روغن سوسن" به دست می آید که کنیپ[1] آن را جهت رفع سوختگی ، درمان اولسرها ، رفع لکه های خرمایی صورت و عوارض اگزمایی ،کوفتگی ها ، دررفتگی اعضا ، رفع در دردهای روماتیسمی، نقرسی و غیره توصیه کرده است (زرگری،۱۳۷۲) .

از پیازهای خشک لیلیوم در طب سنتی چین به منظور درمان سرفه و هیجانات روحی استفاده می شود . عقیده بر آن است که هر چه این پیازها تلخ تر باشند، مؤثرترند . پیازهای گونه *L. regale* تلخ و غیر خوراکیند . از عصاره الکلی آن گلیکوزید و رگالوزید[2] A , B بدست آمده است. در مطالعه ای که بر روی پیاز گونه *L. henryi* انجام گرفت چند گلیکوزید فنولیک تلخ و چند استروئید گلیکوزید از پیازهای تازه آن جدا گردید (Mimaki and Sashida ,1990). در طب سنتی چین از پیازهای لیلیوم به منظور رفع کوفتگی ، و به عنوان آرامبخش و ضد التهاب استفاده می شود (Shimamura *et al* ., 1988).

احتمالاً گونه سوسن چلچراغ نیز دارای خواص درمانی و ترکیبات شیمیایی مفیدی است و لازم است تا تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت بگیرد .

۲,۶. روشهای تکثیر لیلیوم

دیمتر الهه کشاورزی و باروری یونان باستان، عاشق جنس لیلیوم بود زیرا کمتر جنسی از گل از روشهای مختلف بدین صورت تکثیر می گردد(Feldmaier,1979) . هر موجودی که بر روی

[1] Kniepp
[2] Regalosides A & B



زمین وجود دارد چرخه زندگی شامل تولد ، رشد ، بلوغ ، تکثیر و مرگ را طی می کند . تکثیر برای ادامه ی بقای یک گونه و تولید نسل جدید از نسل پیشین ضروری می باشد. به طور کلی ۲ روش تکثیر برای لیلیوم وجود دارد:

۱- تکثیر جنسی ۲- تکثیر غیر جنسی

۲,۶,۱. تکثیر جنسی لیلیوم

دو مرحله ضروری در تکثیر جنسی عبارتند از :

۱. میوز : یا تقسیم سلولهای اسپورفیتیک[1] به گامتهای هاپلوئید

۲. لقاح : عملی است که طی آن گامتهای نر و ماده ترکیب شده و تشکیل سلول تخم دیپلوئید را می دهند سپس سلول تلقیح شده و به بذر تبدیل می شود (Bendere and Pande ,2000) .

تکثیر از طریق بذر روش عمده ای است که گیاهان در طبیعت توسط آن اغلب تولید مثل می کنند. این روش یکی از مؤثرترین روشهای افزایش گیاهان است که به میزان زیادی کاربرد دارد . گیاهی که از بذر تولید شده دانهال[2] نامیده می شود (خوشخوی،۱۳۷۳). معمولاً بذور لیلیوم را در پائیز هنگامی که جوان هستند می کارند . البته بذر اغلب لیلیوم ها را می توان تا بهار نگهداری کرده و آنگاه آنها را کاشت ولی درصد جوانه زنی آنها کم می شود (Toogood,1999) .

به منظور تکثیر از طریق بذر هنگامی که کپسول بذر شروع به قهوه ای شدن کرد و علائم ترک خوردگی روی کپسول ظاهر گردید ، آن را جمع کرده و در جعبه ای در محلی خشک و دارای تهویه قرار داده می شود سپس آن را بسته بندی کرده و زمان جمع آوری روی آن یادداشت می گردد .

[1] Sporphitic
[2] Seedling



بذور لیلیوم نسبتاً سبک هستند به طوریکه ۲۴۰۰ بذر رقم 'album' *L. martagon* در حدود یک اونس[1] وزن دارد . برخی از بذور به علت عدم گرده افشانی مناسب بارور نمی شوند . کیفیت بذور لیلیوم را می توان توسط نگهداشتن در مقابل نور و جستجوی جنین به سادگی آزمایش کرد . بذوری که فاقد جنین هستند غیر بارورند و قادر به جوانه زنی نمی باشند (Hubert *et al.*, 1957). کلیه ی لیلیوم ها بذر تولید می کنند اما رشد آنها کم است و نیاز به مراقبت ویژه دارند ضمن اینکه پیازهای حاصل شبیه به اصل[2] نیستند و اغلب زیبایی و قدرت رشد خودرا از دست می دهند. بذور برای رشد نیز به زمان بیشتری احتیاج دارند و حداقل به ۳ سال زمان تا هنگام گلدهی نیازمند هستند؛ همچنین ازدیاد توسط بذر باعث عدم یکنواختی در گلدهی (همه پایه های حاصل گل نمی دهند)، ارتفاع گیاه، و تعداد گل می شود . از طرفی باید گفت ازدیاد توسط بذر لیلیوم ۳ مزیت عمده نیز دارد :

۱. گیاهانی که از بذر می رویند عمدتاً عاری از بیماریهای ویروسی هستند .

۲. در زمان های مختلف می توان بذر را کاشت .

۳. ازدیاد توسط بذر روشی ساده و ارزان است (Feldmaier,1979).

۲,۶,۱,۱. طبقه بندی جوانه زنی بذور لیلیوم

لیلیوم ها متعلق به رده تک لپه ایها هستند یعنی فقط یک برگ بذری تولید می کنند و اولین برگی که ظاهر می شود از بذر است . بر حسب نوع جوانه زنی ، بذور لیلیوم به ۴ گروه تقسیم می شوند:

---

[1] Ounce هر اونس معادل ۲۸/۳ گرم است

[2] True to type



۱. بذوری که به صورت برون خاکی [1] جوانه می زنند و جوانه زنی بذور به صورت سریع است مثل *L. amabile; L. concolor; L. davidii; L. longiflorum*.

۲. بذوری که به صورت برون خاکی پس از چند ماه جوانه می زنند مثل : *L. candidum; L. henryi; L. pyrenaicum*.

۳. بذوری که لپه در زیر سطح خاک و به دور از دید به صورت دورن خاکی [2] جوانه می زنند و اولین برگی که ظاهر می شود برگ حقیقی [3] است . آنها طی چند هفته جوانه می زنند و کوچکترین گروه در میان لیلیوم ها هستند از قبیل : *L. parryi* ; *L. dauricum*.

۴. بذوری که به صورت درون خاکی و تا ۱ سال طول می کشد که جوانه بزنند مثل : *L. speciosum* ; *L. monadelphum* ; *L. martagon* ; *L. canadense* (Feldmaier,1979; Millidge,1999).

۲,۶,۲. تکثیر غیر جنسی یا رویشی [4]

ازدیاد غیر جنسی شامل تکثیر از اندامهای رویشی یک گیاه اصلی است . این نوع تکثیر از اینرو امکان پذیر است که هر سلول گیاه دارای تمام اطلاعات ضروری ژنتیکی لازم برای باز زایی یک گیاه کامل می باشد . این فرآیند بیولوژیکی را همگروه سازی [5] گویند و جمعیت گیاهی حاصل را همگروه گویند .

دلایل استفاده از تکثیر رویشی:

---

[1] Epigeal
[2] Hypogeal
[3] true leaf
[4] Vegetative propagation
[5] Cloning



۱. نگهداری ژنوتیپ های برتر[1]

۲. یکنواختی جمعیت حاصل

۳. ازدیاد برخی گونه ها که تنها از راههای غیر جنسی تکثیر می گردند

۴. کوتاه کردن زمان لازم تا رسیدن به گلدهی

۵. ترکیب بیش از یک ژنوتیپ بر روی یک گیاه مثل پیوند زدن

۶. کنترل شکل رشد

دو عیب تکثیر رویشی پیازها عبارتند از :

۱. آلودگی مجدد پیازها

۲. سرعت نسبتاً کند تکثیر

تکثیر رویشی را می توان به باززایی یا تشکیل افراد جدید از هر بخش رویشی پیکر گیاه تعریف کرد . (Hartmann *et al.*,1997).

۲,۶,۲,۱. تمایز اندامها

مشاهده لایه های زاینده ای که درنتیجه تحریکهای ناشی از ایجاد زخم و بریدگی در داخل کال[2] تشکیل می شوند و همچنین لایه های زاینده ای که به طور طبیعی در داخل گیاه به وجود می آیند این نکته را روشن می کند که سلولهای تمایز یافته گیاهان می توانند به طور مصنوعی به عقب برگردند و فعالیتهای دوران جنینی خود را از سر بگیرند . تحولاتی که در سلولهای منطقه بریدگی ایجاد می شود ، ممکن است به تشکیل جزایر کوچکی از سلولهای مریستمی نخستین منتهی گردد که بر حسب شرایط محیط، سازمان جدیدی پیدا کرده و اعضای جدیدی مانند جوانه یا ریشه یا هر دو را

[1] Superrior genotypes
[2] callus



به وجود می آورند. جوانه ها و ریشه های نو پدید گاهی در روی خود کال و زمانی بر روی بافتهایی که قبل از تشکیل پینه (کال) موجود بوده و با دور بودن از محل بریدگی ، اثرات ناشی از بریدگی را دریافت نموده اند ، ظاهر می شوند . بریدگیهای عرضی یا مورب که مانعی جهت گردش مواد غذایی و هورمونی به وجود می آورند باعث تشکیل این اندامها می گردند . قطع روابطی که در حالت طبیعی بین اعضای مختلف یک گیاه وجود دارد و مخصوصاً جدا کردن یک عضو از سایر اعضای گیاهی عامل مؤثر دیگری است که بیش از ایجاد زخم و بریدگی موجبات تشکیل جوانه ها و ریشه های جدید را بر روی قطعات اندامهای گیاهی فراهم می نماید .

جوانه های نو پدید منشاء خارجی داشته و توسط دسته ای از سلولهای منطقه سطحی تشکیل می شوند . در صورتیکه ریشه ها منشاء داخلی دارند و دسته ای از سلولهای منطقه عمیق آنها را به وجود می آورند. در بعضی از حالات استثنایی جوانه ها در فاصله کم و بیش زیادی از سطح نیز به وجود می آیند. موقعی که اندامهای نوپدید شروع به رشد و نمو تمایز می کنند . بافتهای تشکیل دهنده آنها مخصوصاً سیستمهای هادی تدریجاً به بافتهای ساقه یا ریشه ای که آنها را به وجود آورده اند، متصل می شوند . این عمل با تمایز سلولهایی که بین دسته آوندهای جوانه و جوانترین دسته آوندهای ساقه قطع شده قرار گرفته اند همراه می باشد (ابراهیم زاده ،۱۳۷۱) .

در *L. longiflorum* و *L. candidum* سر آغازه های[1] جوانه از یاخته های پارانشیم در طرف بالای فلس های سوخ[2] منشاء می گیرد، درحالیکه سر آغازه های ریشه از یاخته های پارانشیمی ، درست در زیر سر آغازه های جوانه حاصل می شود . هر چند که فلس اصلی به عنوان منبعی غذایی برای توسعه گیاه عمل می کند، سیستم آوندی پیازچه های جوان، از فلس پیاز مادری که نهایتاً چروکیده و از بین می رود ، مستقل می باشد (خوشخوی،۱۳۷۳) .

---

[1] Primordiums
[2] Bulb



۲,۶,۲,۲. ریخت شناسی[1] پیاز گل لیلیوم

پیاز یک اندام تخصص یافته زیر زمینی است که محور کوتاه ، گوشتی و معمولاً عمودی ساقه (صفحه تحتانی[2]) را شامل می شود . در قسمت انتهایی این محور یک نقطه رشد و یا سرآغازه های گل می باشند که توسط فلسهای گوشتی محصور شده اند (Hartmann *et al.*, 1997).

پیازها می توانند پوشش دار مانند لاله و نرگس یا فاقد پوشش مثل لاله واژگون و لیلیوم باشند . فلس ها اولین اندام ذخیره ای پیازهای حقیقی هستند؛ آنها برگهای تغییر شکل یافته اند و دارای روزنه می باشند. پیازهای بدون پوشش را باید از خطر خشک شدن محافظت کرد. (De Hortogh and lenard , 1993). صفحه ی قاعده ای پیاز دارای ریشه های نابجا می باشد . ریشه های قوی و متعدد در بهار از صفحه ی تحتانی ظاهر شده و آب و مواد غذایی را جذب می کنند، همچنین آنها به عنوان تکیه گاه عمل می کنند. درپیازهای جوان این ریشه هابه طرز خارق العاده ای متراکم[3] هستند. هنگامی که گیاه رشد می کند این ریشه ها کوتاهتر شده و پیاز را به عمق مناسب می کشانند این ریشه ها حداکثر تا دو سال باقی می مانند . اگر ریشه ها به هر علتی آسیب ببینند یا خشک شوند پیاز برای سال آینده ضعیفتر خواهد شد (Kawa and De Hortogh , 1999) .

گیاه لیلیوم دارای ریشه های منشعب[4] ، متراکم، و ریشه های مویی[5] می باشد ولی فاقد هرگونه ریشه غده ای است. امروز از روشهای مصنوعی متعددی برای تکثیر رویشی انواع لیلیوم استفاده می شود. چند روش تکثیر غیر جنسی در اینجا ذکر می گردد .

---

[1] Morphology
[2] Basal plate
[3] Contractile roots
[4] Branched
[5] Root hairs



۲,۶,۲,۳. تکثیر توسط تقسیم پیاز

لیلیوم ها به طور طبیعی نیز تکثیر می شوند اما این تکثیر به جز در مورد چند گونه کند بوده و از نظر ازدیاد باستثنای باغبانی در خانه ، ارزش ناچیزی دارد . به طور مثال گونه های : *L. henri; L. hansonii; L. regale; L. concolor* با شکاف خوردن پیاز افزایش می یابند به این صورت که دوتا چهار پیازچه جانبی در انتهای پیاز مادری جوانه می زنند . در طی این فرآیند ، پیاز مادری از بین رفته و خوشه ای فشرده[1] از پیازهای جدید به جای می ماند . هیبیردهای *L. davidii; L. umbellatum; L. tigrinum* درطی سال اول به دو قسمت که دارای ساقه اصلی باشند تقسیم شده و در سال دوم هر قسمت قادر به گلدهی می باشد؛ اینکار برای جلوگیری از تشکیل پیازهای چند تایی بزرگ و ضعف رشد گیاه و کاهش قدرت گلدهی بهتر است هر ساله انجام گیرد . معمولاً این کار در بهار یا پائیز و قبل از شروع رشد جدید انجام می گیرد زیرا نه تنها زمان خوبی برای این عمل است بلکه پیازها به سادگی جدا شده و منتقل می شوند . برخی ارقام چون : *L. pardalinum ; L. candense ; L. harrisianum ; L. superbum* دارای پیازهای ریزوم شکل هستند که نمو پیاز جدید، در سیستم ساقه زیر خاکی است . در صورتیکه پیازها هنوز قوی نشده باشند، به خصوص در مورد گونه های *L. pardalinum* ; *L. harrisianum* هر چهار سال یکبار باید آنها را جدا کرده و به صورت جداگانه کاشت .

برخی گونه ها چون *L. speciosum* تولید پایگاههایی[2] در اطراف پیاز مادری می کنند که طی دو تا چهار سال به گلدهی می رسند و آنها را در پائیز می توان جدا کرد و درون کمپوست با pH اسیدی به همراه مقدار مساوی از ماسه زیر درون گلدان یا بستر خزانه کاشت . همچنین برخی از لیلیوم ها از قبیل :

---

[1] Tight Cluster
[2] Offset



L. pardalinum; L. longiflorum; L. loncifolium; L. ;L. speciosum candense L. bolbiferum; L. auratum معمولاً در زیر سطح خاک و در زیر ساقه گلدهنده تولید پیازچه های ریشه دار می کنند ، پیازها را در اوایل بهار هنگامی که راکد هستند برداشته و پیازچه ها را جدا می کنند و سپس آنها را درون گلدانهایی کاشته و در سایه در محلی بدور از سرما قرار می دهند . پیازچه ها به جز پائیزی که در پیش رو دارند ۳ تا ۴ سال بعد به گلدهی می روند . در اوایل پائیز قبل از اینکه ساقه کاملاً خشک شود برای جلوگیری از شلوغ شدن گیاه مادری ساقه را باید جدا کرد.(خوشخوی ۱۳۷۳ ؛ Feldmier,1979)

۲,۶,۲,۴. تکثیر توسط پیازچه های هوایی[1]

پیازچه هوایی، پیاز کوچکی است که در محور برگها تشکیل شده یا در محل گل در روی گل آذین قرار بگیرد (Pollock and Griffith , 1998) . پیازچه های هوایی در برخی از گونه های لیلیوم مانند : *L. sulphureum; L. sargentiae; L. trigrinum; L. L. bolbiferum: chalcedonicum; L.lancifolium; L.xtestaceum* تشکیل می شوند . پیازچه های هوایی در اوایل فصل رشد توسعه یافته و چندین هفته پس از گلدهی گیاه به زمین می ریزند. جمع آوری پیازچه های هوایی در زمان رسیدن آنها که معمولاً در اواخر تابستان است صورت می گیرد . سپس آنها را در گلدانها یا سینی هایی می کارند تا ریشه دار شوند و در پائیز هر گیاه به گلدان دیگری منتقل می شود .

همچنین می توان لیلیوم والد را پس از گلدهی به صورت افقی درون شیاری قرار داد و پیازچه های هوایی راروی آن ریشه دار نمود به طوریکه پیازچه های هوایی در طول ساقه ریشه دار شوند

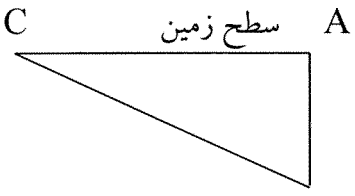
[1] Bulbil



سپس پیازچه هایی ریشه دار را جدا کرده و مجدداً در بهار می کارند. از مزایای این روش رسیدن سریع به اندازه ی گلدهی است . پیازچه های هوایی برای رشد برگ نیاز به گذراندن یک دوره سرمایی به مدت حدود ۳ ماه و دمای $^{\circ}C$ ۸-۲ دارند . اگر این دوره ی سرمایی را دریافت نکنند نمو برگ بسیار ضعیف یا حتی بی برگی پیش خواهد آمد. پیت خزه یکی از بهترین محیط ها بدین منظور است و معمولاً رطوبت مناسب را برای مدت زیادی در خود محفوظ نگه می دارد و نتایج موفقیت آمیزی می دهد .

در برخی از گونه ها که به طور طبیعی پیازچه های هوایی تولید نمی کنند می توان به سه روش مصنوعی زیر پیازچه های هوایی تولید کرد :

۱. ساقه در هنگامی که گیاه در حالت گلدهی کامل است پیچانده و در یک شیار در بستر خزانه قرار داده می شود؛ در شکل زیر CA سطح خاک و AB عمق استقرار پیازاشت که باید در حدود ۱۵-۱۰ cm باشد و ساقه به صورت اریب مانند شکل خوابانده می شود به طوریکه یک چهارم انتهایی ساقه از خاک بیرون باشد سپس روی پیاز با ماسه نرم پوشانده می شود. پس از ۶ تا ۸ هفته پیازچه ها در طول ساقه ظاهر شده و می توان آن ها را جدا کرد .



شکل ۳-۲ : یک روش مصنوعی برای تولید پیازچه های هوایی

۲. قطع کردن نیمی از ساقه؛ در نیمه ی پایانی ساقه پیازچه های هوایی تشکیل می شوند .



۳. پس از گلدهی و قبل از اینکه برگها از بین بروند قسمتی از ساقه به همراه ۳ تا ۴ برگ انتهایی حذف شده و پیازچه ها در محور برگها تشکیل می شوند (Hubert, 1957; Brickell ,1996).

۲,۶,۲,۵. تکثیر از طریق قلمه برگی

اکنون مشخص گردیده که برخی از گونه های لیلیوم مثل *L. longiflorum* و *L. lancifolium* را می توان توسط قلمه برگی تکثیر کرد. برگهای سالم را که به تازگی بالغ شده اند انتخاب کرده آنها را به دقت بدون اینکه پاشنه ای[1] از ساقه در آنها باقی بماند جدا می کنند؛ برگها را درون کیسه ی پلاستیکی قرار می دهند تا از تبخیر آب آنها جلوگیری شود. یک محلول قارچکش تهیه کرده قلمه برگی را در آن فرو می برند تا از آلودگی توسط قارچها جلوگیری شود . قلمه ها را در بستر کشت مناسب مثل ورمیکولیت به طوریکه یک سوم هر قلمه درون بستر باشد قرارداده و در یک محل مرطوب و خنک در دمای ۱۸°C-۱۵ نگهداری نموده پس از ۶ هفته در گونه *L. longifolium* ریشه ها و پیازچه ها در انتهای قلمه برگی ظاهر می شوند . قلمه ها را از ورمیکولیت درآورده و هر یک را به تنهایی دورن گلدان حاوی کمپوست در همان عمق قبلی می کارند. هر قلمه را علامت گذاری کرده به خوبی آبیاری می کنند و آن را در محلی خنک و به دور از صدمه سرمازدگی در معرض نور قرار می دهند تا به مدت ۱ سال رشد کند؛ نهایتاً آن را درون گلدانهای بزرگتر یا بستری خاکی در فضای آزاد می کارند. قلمه زنی بهتر است در اواسط تابستان انجام گیرد (Brickell, 1996) .

[1]Heel



۲,۶,۲,۶. تکثیر از طریق فلسهای پیازی (فلس برداری)

در تکنیک فلس برداری هر تک فلس از پیاز مادری جدا شده و در شرایط مناسب رشد قرار می گیرد تا پیازچه های نابجا در پائین هر فلس تشکیل گردد. فلس برداری به گیاهان فاقد پوشش مثل لیلیوم محدود می گردد که فلسهای آن به سادگی جدا می گردند. ازدیاد از طریق فلس برداری یک روش رضایت بخش و مفید برای تکثیر گونه های مختلف لیلیوم است. پیازچه های حاصل از فلس برداری پس از دو تا سه سال رشد در مزرعه می توانند به اندازه تجاری و قابل گلدهی برسند . امروزه بیشتر لیلیوم ها به خصوص ارقام هیبرید بدین طریق به منظور تجاری تکثیر می شوند. برخی گونه ها مثل *L.washingtonianum; L. pardalinum* دارای تعدادی فلس هستند که معمولاً به صورت طبیعی و خودبه خود جدا می شوند . در گونه *L. martagon* و سایر گونه هایی که مخصوص نواحی با آب و هوای زمستانی سخت هستند ،یک دوره سرمایی زیر ۳ °C- برای شروع رشد فلسها مفید می باشد. برای فلس برداری باید از گیاهان قوی و عاری از بیماری استفاده کرد با این روش می توان گیاهانی تولید کرد که دارای کیفیت بالایی باشند و گیاهان جوان تولید شده نیز به خوبی استقرار یابند. برای موفقیت در این روش کنترل شرایط محیطی چون رطوبت، تهویه، و گرما ضروری می باشد. در فلس برداری دو قلو[1] باقی گذاردن قطعه ای از صفحه ی تحتانی الزامی است اما این باقی گذاردن در فلس برداری ضروری نیست. بهترین زمان برای فلس برداری در مرحله رکورد قبل از اینکه ریشه های جدید شروع به رشد کنند می باشد.

پس از اینکه اندامهای هوایی خشک شدند تعدادی از پیازهای بالغ را درآورده و خاک آنها را تکان می دهند و فلسهای آسیب دیده و خراب را جدا کرده و به دور می ریزند . معمولاً چند ردیف فلس خارجی را جدا کرده پیاز مادری را پس از تیمار با قارچکش مجدداً می کارند فلسهای جدا شده

[1] Twin scaling



را با قارچکشهایی چون کاپتان[1] ، تیرام[2] ، یا بنومیل[3] ضد عفونی کرده و در محیطی گرم و مرطوب در مکانی مناسب که می تواند پیت[4] یا مخلوط پرلیت[5] و پیت یا ورمی کولیت[6] باشد نگهداری می کنند . یکی از بسترهای بسیار مناسب برای عمل فلس برداری پیت است . پیت عبارتست از بقایای گیاهان مردابی[7] ، لوشاب[8] ، و خلیش که در زیر آب در حالتی نیمه پوشیده باقی مانده اند. نبود اکسیژن ، پوسیدگی باکتریایی و شیمیایی مواد گیاهی را کند می کند. ترکیبات پیت های مختلف بر حسب نوع گیاهانی که از آن به وجود آمده اند، مقدار مواد کانی و درجه اسیدی بودن متغیر است؛ پیت خزه که عمدتاً در فلس برداری استفاده می گردد از خزه اسفاگنوم و یا خزه های دیگر به وجود می آید. از نظر رنگ، از قهوه ای مایل به زرد تا قهوه ای تیره متغیر است و از نظر نگهداری رطوبت ۱۵ برابر وزن خشک خود ظرفیت نگهداری آب را دارد . این پیت دارای حالت شدید اسیدی یعنی pH بین ۳/۲-۴/۵ می باشد و دارای مقدار کمی نیتروژن در حد ۰/۱ می باشد ، اما مقدار فسفر و پتاسیم آن ناچیز و یا صفر است. این نوع پیت در باغبانی بیشتر استفاده می شود .

نیمی از ظروف را با محیط کشت پر کرده و سپس فلسها را درون آن می کارند. فلسها را مرطوب نگه داشته و در دمای مناسب بسته به گونه مورد نظر در حدود ۲۵-۱۷ °C در گلخانه نگهداری می کنند. پس از چند ماه فلس ها را بررسی می کنند؛ اگر ریشه های جدید بر روی صفحه تحتانی نازک پیازچه رشد کرده باشند به علاوه در انتهای فلس ها پینه تشکیل شده باشد، پیازچه ها را جدا کرده و به صورت انفرادی یا چند تایی بسته به اندازه درون گلدانی که با کمپوست یا خاک نرم و

---

[1] Captan
[2] Thiram
[3] Benomyl
[4] Peat
[5] Perlite
[6] Vermiculite
[7] Marsh
[8] Bog



پیت پر شده می کارند. پس از ۴-۳ سال گیاهان گل تولید خواهند کرد. به منظور بدست آوردن پیازچه های بیشتر می توان آنها را با مواد محرک رشد چونTA, NAA, IBA و... تیمار کرد . هر فلس معمولاً یک تا چند تا پیازچه در سطح زخمی جدا شده از پیاز تولید می کند (Bricklle,1996; Toogood,1999) .

در طی نمو متداول پیازچه هایی تشکیل شده از طریق فلس برداری چهار مرحله دیده می شود :

۱. تشکیل پینه و متعاقب آن تشکیل مریستم سازمان یافته

۲. تشکیل سرآغازه های برگ

۳. تشکیل و بزرگ شدن پیازچه های فلسی

۴. ظهور برگ از سرآغازه ها

پس از اینکه پیازچه ها تشکیل شدند برحسب نوع ظهور برگ به چهار دسته تقسیم می شوند :

- ETP[1] گیاهانی که به صورت روخاکی تولید پیازچه هایی با برگهای حقیقی بر روی ساقه می کنند؛ این نوع مطلوبترین شکل نمو است.
- HETP[2] اولین برگ به صورت روزت[3] (کپه ای) با برگ فلسی ظاهر می شود و در مرحله بعد ساقه به وجود می آید.
- HTP[4] فقط برگهای کپه ای با برگهای فلسی تولید می کنند. هر دو نوع HTP و HETP به بیماریها ا و اسپری آب حساس هستند زیرا برگها نزدیک سطح خاک باقی می مانند.

---

[1] Epigeous Type Plant
[2] Hypo Epigeous
[3] Rosette
[4] Hypogeous



• NLB[1] هیچ برگ سبزی تولید نمی کنند. پیازچه های راکد در همان فصل رشد، برگی را بر سطح خاک ظاهر نمی سازند . (Marianangeli and curvetto, 1997 a).

۲,۷. تکثیر از طریق کشت بافت گیاهی[2]

۲,۷,۱. تاریخچه کشت بافت گیاهی

در طی دهه های اخیر کشت بافت به عنوان یک تکنیک مهم و مؤثر توسط تکثیر کنندگان تجاری گیاهان و بهنژادگران به کار گرفته شده است. کشت بافت گیاهان عالی امروزه به خوبی استقرار یافته و تقریباً کلیه گونه ها امکان کشت بافت را یافته اند. بیش از ۲۵ سال است که از این تکنیک به صورت تجاری استفاده می شود. درسال ۱۹۹۰ بیش از ۳۰۰۰ آزمایشگاه تجارتی در سطح جهان به کار کشت بافت مشغول بوده اند. در دهه ی ۱۹۷۰ بیشتر این آزمایشگاهها در آمریکا و هلند واقع بودند اما از دهه ۱۹۸۰ به بعد بیشتر این فعالیتها به علت هزینه های کمتر تولید و شبکه حمل و نقل هوایی به مناطقی در آسیا، اروپای شرقی و آمریکای مرکزی انتقال یافتند. این تکنیک روش ارزشمندی برای تکثیر فراوان و سریع گیاهان از مقدار ماده اولیه گیاهی اندک می باشد. در سال ۱۹۹۱ حداقل ۵۰۰ میلیون گیاه که در حدود ۹۰٪ آنها زینتی بوده اند از طریق کشت بافت تکثیر شده اند (Linde,1992) .

در جدول شماره ۱-۲ میزان تولید گیاهان از طریق کشت بافت طی سالهای ۹۹-۱۹۹۸ آورده شده است (آزادی و معینی ؛۱۳۸۰). همانطورکه در جدول دیده می شود کشورهای اروپایی با تولید ۱۷۹ میلیون گیاه در رتبه ی اول و کشورهای افریقایی با ۴۶ میلیون گیاه در رده ی آخر جای می گیرند . ریز ازدیادی گیاهان زینتی امروزه به صورت گسترده ای انجام می گیرد و در مورد محصولات پیازی

[1] Non Green Leaf Bulb
[2] Plant Tissue Culture



یک روش مطلوب برای تولید پیازچه است که سبب رشد بهتر و گلدهی سریعتر پس از انتقال به خاک می گردد. از آنجائیکه پیازها به عوامل بیماریزا به خصوص بیماریهای ویروسی بسیار حساس هستند لذا کاهش دوره تولید پیاز تا رسیدن به اندازه قابل فروش اهمیت زیادی دارد (Gerrits and De Klerk ,1992).

جدول ۱- ۲ : تولید گیاهان از طریق کشت بافت طی سال ۹۹-۱۹۹۸ (میلیون گیاه)

کشورهای اروپایی	۱۷۹
کشورهای آسیایی	۱۵۵
آمریکای جنوبی و مرکزی	۱۵۵
آمریکا و کانادا	۱۱۰
خاورمیانه و فلسطین اشغالی	۹۲
استرالیا و نیوزیلند	۸۵
آفریقا	۴۶

تکثیر از طریق کشت بافت در لیلیوم به صورت گسترده ای مطالعه شده و به منظور تکثیر از ریز نمونه های برگ ، فلس ، ساقه ، گلبرگ و دمگل استفاده شده است. ثابت شده است که قطعات فلسهای پیاز لیلیوم ریز نمونه های مناسبی برای تکثیر از طریق کشت بافت هستند (Niimi,1995).

در کشور هلند تعداد پیازچه های لیلیوم تولید شده از طریق کشت بافت از ۰/۶ میلیون در سال ۱۹۸۳ به ۱۵/۷ میلیون گیاه در سال ۱۹۸۸ رسید و در سال ۱۹۸۹ این رقم به بیش از ۱۶ میلیون پیاز افزایش پیدا کرد (Pierik,1990) . در این کشور ۹۷٪میزان کشت بافت گلهای پیازی را لیلیوم



تشکیل می دهد. در سال ۱۹۸۸ لیلیوم دومین ناحیه کشت بزرگ در هلند را به خود اختصاص داده بود.(Harper,1991).

۲,۷,۲. مبانی کشت بافت

به کشت سلول، بخش یا اندامهایی از گیاه در محیط فاقد عوامل بیماریزا در محیط مصنوعی کشت بافت گفته می شود. اصطلاح کشت بافت به دامنه وسیعی از روشهای مورد استفاده برای رشد بافتهای گیاهی مثل پینه، سلول، پروتوپلاست و اندامهایی چون ساقه ها، ریشه ها، و جنین در محیط ضد عفونی شده یا درون شیشه ای گفته شده است (Hartmann *et al* .,1997). در ابتدا منظور از کشت بافت بررسی قابلیت تبدیل یک سلول گیاهی به گیاه کامل بود ولی به تدریج کشت بافت در مطالعات سیتولوژی ، فیزیولوژی ، و بررسی نحوه ی تمایزیابی[1] و ریخت زدایی[2] قسمتهای مختلف یک گیاه به کار گرفته شد و سیستمهای ویژه ای را جهت بررسی در این زمینه فراهم نمود. در سال ۱۸۳۸ شوان[3] واشلیدن[4] فرضیه توانمندی[5] را ارائه نمودند؛ براساس این تئوری هر سلول مستقل بوده و استعداد ژنتیکی لازم را برای تشکیل و تکامل یک گیاه کامل دارا است به شرط اینکه در شرایط مطلوب قرار بگیرد. در واقع تئوری آنها ، پایه و اساس کشت بافت و سلول گیاهی است .(Pierik,1997)

می توان گفت تکثیر گیاهان از طریق کشت بافت به سال ۱۹۰۲ بر می گردد، زمانی که هابرلند[6] به تکثیر گیاهان از یک سلول توجه کرد . او توانست از گیاه برگ بیدی[7] سلولی را

---

[1] Differentiation
[2] Dedifferentiation
[3] Schwann
[4] Schleiden
[5] Totipotency
[6] Haberlandt
[7] Tradescantia Sp



جدا کند و در محیط غذایی آن را کشت دهد . عمل تقسیم سلولی انجام گرفت ولی موفق به ایجاد گیاه کامل نگردید. تا سی سال بعد پیشرفت چندانی در این زمینه حاصل نگردید تا اینکه در سال ۱۹۳۴ وایت[1] توانست توده ای از کالوس (توده ای از سلول های تمایز نیافته در حال تقسیم که اغلب در محل زخم ها و جراحت های وارده به بافت ها تولید می شود) گوجه فرنگی را از طریق کشت ریشه بدست آورد. در سالهای بعد گوترت[2] و نوبکزت[3] توانستند از ریشه ی هویج، کالوس تهیه کرده و این کالوس پس از رشد به گیاه کامل تبدیل گردید (Murashige,1977) .

در سال ۱۹۵۷ یک مقاله مهم توسط اسکوگ و میلر[4] انتشار یافت که در آن فرض شده بود اثر متقابل کمی بین اکسینها و سایتوکینینها ، تعیین کننده نوع رشد یا تمایز بافتها می باشد . مطالعات آنها بر روی تنباکو نشان داد که نسبت بالای اکسین به سایتوکینین سبب القای ریشه زایی می گردد ولی از شاخه زایی ممانعت به عمل می آورد . بعدها مشخص گردید که این الگو عمومی نیست و بسیاری از عوامل دیگر نیز بر روی توانایی سلولها و بافتها در کشت برای تمایز یابی به ریشه ، شاخساره یا جنین دخیل هستند (Taji *et al* .,1997). کاربرد شیوه های کشت بافت به منظور باززایی و تولید تجاری گیاهان به طور کامل، پیشرفتی است که اخیراً صورت گرفته است و در دامنه ی گسترده ای از گونه های گیاهی، این روش ها جایگزین مهمی برای اکثر شیوه های عادی ازدیاد بشمار می آید. کشف ریز ازدیادی[5] از طریق کشت بافت، حاصل کوششهایی است که از طریق جداسازی مریستم های غیر آلوده به منظور دستیابی به گیاهان عاری از ویروس انجام شده است . اولین و تا این تاریخ

---

[1] White
[2] Gouthere
[3] Nobercourt
[4] Skog and Miller
[5] Micropropagation



گسترده ترین کاربرد عملی فنون کشت بافت در فرآورده های باغبانی در افزونگری گونه های زینتی می باشد. مورل[1] با بکارگیری این شیوه برای ارکیده های سیمبیدیم[2] پی برد که نوک شاخه به شکل توده هایی از پداژه[3] نما تکثیر پدا کرده است که می توانند تقسیم شوند و دوباره کشت گردند و گیاهان جدیدی را به وجود آورند . از آنجائیکه افزونگری همگروه های ارکیده به روش سنتی بسیار کند بود، ازدیاد رویشی از طریق کشت بافت به میزان زیادی افزایش یافته و جایگزین روش های قبلی گردیده است. شیوه های کارمورل در مورد بسیاری از گونه های گیاهی به کار گرفته شده است (خوشخوی ،۱۳۷۳).

۲,۷,۳. موارد استفاده از کشت بافت

به طور معمول موارد کاربرد این تکنیک به ۵ دسته تقسیم می شود :

۱. مطالعه رفتار سلولی

۲. تغییر و بهبود گیاه

۳. تولید گیاهان عاری از بیماری و حفظ ژرم پلاسم

۴. تکثیر همگروه ها

۵. تولیدات ثانویه گیاهی (Smith,2000)

[1] Moreal
[2] Cymbidium
[3] Corm



۲,۷,۴. ریز ازدیادی

به تکثیر گیاهان از طریق فنون کشت سلول ، بافت یا اندام گیاهی بر روی محیط کشت مصنوعی و در شرایط درون شیشه ای ریز ازدیادی اطلاق می گردد . خصوصیات کلی این فنون عبارتند از :

۱. بافتهای گیاهی در داخل ظروف کوچک شیشه ای یا پلاستیکی و بر روی محیط کشت مصنوعی کشت می شوند .

۲. تمامی مراحل کار در شرایط عاری از هر گونه عوامل بیماریزا و آلوده کننده صورت می گیرد .

۳. پس از کشت ، ظروف کشت در شرایط دمایی، رطوبتی و نوری مناسب قرار می گیرند .

۴. الگوی متداول نمو ازبین رفته و نمو به یکی از شکلهای اندام زایی[۱] ، جنین زایی[۲]، کالوس زایی[۳] و . . . انجام می گیرد .

تمام سیستمهای ریزازدیادی با جدا کردن قطعه ی کوچکی از گیاه و پاک کردن آلودگی ها و قرار دادن آن در محیط کشت آغاز می گردد. این قطعه جدا شده را که برای شروع مراحل مختلف به کار برده می شود ریز نمونه[۴] گویند و واحد اصلی کشت بافت به شمار می آید و معادل اصطلاحاتی چون قلمه ، پیوندک و یا بذر در روشهای کلاسیک تکثیر می باشد (خوشخوی،۱۳۷۳) .

۲,۷,۵. معایب ریز ازدیادی

تسهیلات مورد نیاز برای اجرای این روش، گرانبها بوده و ممکن است که ملاحظات اقتصادی، کاربرد آن را در بازار تجاری برخی از گیاهان توجیه نکند. انجام روشهای این نوع ازدیاد به

---

[1] Organogenesis
[2] Embryogenesis
[3] Callogenesis
[4] Explant



مهارتهای ویژه ای نیاز دارد. خطاهایی که در نگهداری هویت ارقام رخ می دهد ، مثل وارد کردن یک عامل بیماریزای ناشناخته و یا ظاهر شدن یک گیاه جهش یافته ممکن است در سطحی گسترده و مدتی کوتاه افزایش یابند، از اینرو برای ممیزی ارقام در این روش ازدیاد، برقراری سیستم های خاصی ضروری است. در برخی ارقام و سیستمهای کشت، ممکن است تغییرات خاص ژنتیکی واپی ژنتیکی در گیاه پدید آیند و احتمالاً سبب تغییر گیاه حاصله شوند. آگاهی از این مشکلات و ارزیابی اثرات آنها بر روی تولید برخی ارقام می بایستی در یک برنامه ریز ازدیادی مورد توجه قرار بگیرد.

۲,۷,۶. انواع باززایی درکشت بافت

در سیستمهای کشت بافت پنج نوع باززایی رویشی اساسی وجود دارد که عبارتند از :

الف: کشت مریستم[1]

یکی از نقاط رشد گیاه مریستم انتهایی است که بر روی نوک ساقه ای در هم فشرده که از چندین گره و میان گره تشکیل شده، وجود دارد. در هر گره برگهایی که رشد و توسعه نیافته اند در محل تقاطع برگها با ساقه دارای مریستم جانبی می باشند. طویل شدن نوک ساقه هنگامی رخ می دهد که ازدیاد طولی مریستم انتهایی بر روی نوک شاخه ی جدا شده در محیط کشت ادامه یابد تا ریشه دار شده و گیاهچه کوچکی ایجاد شود. این شیوه در ابتدا برای تولید گیاهان عاری از ویروس[2] بکاربرده شد که در آنها فقط مریستم انتهایی (کمتر از mm ۰/۵) همراه با چند برگ زیر آن برداشته می شود (متصل نبودن بافت بسیار جوان مریستم به سیستم آوندی گیاه مادری، مانع از انتقال ویروس ها به این بافت می شود). اگر تشکیل ریشه بر روی ریز نمونه ممکن نباشد می توان در شرایط گندزایی

[1] Meristem culture
[2] Virus free



شده عملیات ریز پیوندی[1] را بر روی یک دانهال و یا یک گیاهچه پایه ای ریشه دار شده انجام داد. باززایی با طویل شدن مریستم انتهایی ساقه صورت می پذیرد . با اجرای این روش در هر کشت فقط یک گیاه بدست می آید .

ب: پرآوری شاخساره جانبی[2]

در تشکیل شاخساره جانبی ، نقاط رشد جانبی بر روی ریزنمونه در محل گره ها و پائین مریستم انتهایی تحریک به رشد شده و از رشد مریستم انتهایی جلوگیری می شود . رشد این شاخساره های جانبی باعث پیدایش سیستم افزونگری سریعی شده و طی آن شمار گیاهان با کشت های مکرر به صورت تصاعدی افزایش می یابد .

ج: تشکیل شاخساره نابجا[3]

انگیزش مستقیم شاخساره نابجا بر روی ریشه ، برگ و فلس پیاز و دیگر اندامهای یک گیاه کامل از روشهای معمول ازدیاد می باشد. همچنین این نوع شاخساره ممکن است که پس از زخم زنی به صورت باززایی، از توده های پینه ای پدید آید . در کشت بسیاری از گونه ها می توان قسمتهای جدا شده ی گیاه را تا میزان بسیاری به تشکیل شاخساره نابجا وادار ساخت. این روش نرخ تکثیری[4] بیشتری در مقایسه با کشت شاخساره جانبی دارد . از طرف دیگر شاخساره جانبی ممکن است باعث ایجاد گیاهان غیر طبیعی گردد.

---

[1] Microgafting
[2] Axilly shoot proliferation
[3] Adventitious shoot regeneration
[4] Rate of multiplication



د: اندام زایی[1]

این فرآیند شامل نمو شاخساره یا ریشه های نابجا است و تغییراتی در سلولها را شامل می شود که منجر به توسعه یک ساختار تک قطبی[2] مثل سرآغازه ساقه یا ریشه گردد. سیستم آوندی معمولاً به گیاه والد پیوسته باقی می ماند. طبق نظر هیکس[3] (۱۹۸۰) بر حسب تشکیل یا عدم تشکیل پینه، اندام زایی به صورت انجام می گیرد :

۱. اندام زایی غیر مستقیم[4] : دراین روش میزان گوناگونی ژنتیکی مثل تغییرات پلوئیدی در سلولها بیشتر اتفاق می افتد که به این تغییرات گوناگونی بدنی[5] گویند وطی این فرآیند از

ریز نمونه اولیه ← پینه ← مریستموئید[6] ← سرآغازه اندام تولید می گردد.

۲. اندام زایی مستقیم[7] : در اندام زایی مستقیم، پینه تشکیل نشده و اندام زایی به صورت مستقیم از ریزنمونه اولیه انجام می گیرد.

ریز نمونه اولیه ← مریستموئید ← سرآغازه

مراحل اندام زایی به صورت تمایز زدایی، القا و تمایزیابی ذکر شده اند (Schwarz and Beaty,2000) . سلولهای پینه ای که عمدتاً پارانشیمی هستند می توانند مریستمهایی را تولید کنند که باعث آغازش[8] اندامها گردد. این فرآیند مشابه القای شاخساره نابجا بر روی ریز نمونه هاست با این تفاوت که دوره ی رشد مستقل پینه، در میان مراحل دیگر قرار می گیرد (خوشخوی ،۱۳۷۳) .

---

[1] Organogenesis
[2] Unipolar
[3] Hicks
[4] Indirect Organogenesis
[5] Somaclonal Variation
[6] Meristemoid
[7] Direct Organogenesis
[8] Initiation



ج:رویان زایی بدنی[1]

فرآیندی که طی آن رویانواره[2] از یاخته های غیر جنسی به صورت یک ساختار دو قطبی دارای رأس ساقه و ریشه با ارتباط آوندی مستقل تشکیل می شود. در رویان زایی بدنی نیز مانند اندام زایی دو نوع متفاوت از تولید جنین قابل تشخیص هستند :

۱. **روش مستقیم :** دراین روش جنین مستقیماً از یک سلول یا بافت، بدون تشکیل پینه تولید می شود. سلولهایی که جنین از آنها به وجود می آید، سلولهای مشخص پیش جنینی نامیده می شود. مواد اولیه برای تولید جنین در این روش قبلاً کاملاً جوان می شوند.

۲. **روش غیر مستقیم :** در این روش ابتدا کالوس تشکیل شده و سپس جنین از آن تولید می گردد. سلولهایی که از آنها جنین تشکیل می شود سلولهای معین جنین زا نامیده می شوند که در اثر تحریک شدن، تشکیل جنین می دهند. در این روش، سلولهای تمایز یافته ابتدا باید تمایز زدایی شده و پس از تقسیم سلولی جهت تولید جنین استفاده شوند (باقری،۱۳۷۶؛خوشخوی،۱۳۷۳) .

۲,۸. تنظیم کننده های رشد

کاربرد تنظیم کننده های رشد برای دستکاری[3] رشد و نمو گلها نسبت به سایر محصولات کشاورزی متداولتر می باشد زیرا گلها کالاهایی لوکس هستند و بازده بالای سرمایه گذاری بر روی آنها هزینه استفاده از تنظیم کننده های رشد را تأمین می کند و چون زینتی هستند مانند محصولات خوراکی خطری را ایجاد نمی کنند. ترکیبات شیمیایی خارجی به منظور تغییر تعادل داخلی به کار می روند و باعث تحریک و یا ممانعت از آغازش گل می شوند (معمار مشرفی،۱۳۷۷). استفاده از

[1] Somatic embryogenesis
[2] Embryoid
[3] Manipulation



تنظیم کننده های رشد می تواند بر تمایزیابی بافتها تأثیر گذاشته و میزان هورمونهای داخلی مواد گیاهی را در اثر جذب این مواد تغییر دهد و بدین وسیله نتایج مورد نظر بدست آید (Krikorian,1995).

ایجاد رشد در بافتهای کشت شده نیازمند حفظ تقسیم سلولی در آن اندام است که به وسیله عکس العمل به حضور ترکیبها و غلظتهای مواد تنظیم کننده رشد صورت می گیرد. تحریک تقسیم سلولی در محیط کشت مربوط به یک حالت مریستمی است که تمایز زدایی[1] نام دارد و تولید گیاه از بافتهای کشت شده نیز بستگی به تمایز مجدد[2] سلولهای تقسیم شده دارد که این امر توسط سطوح مختلف هورمونهای گیاهی ممکن است صورت گیرد. تک لپه ایها در قابلیت تقسیم سلولی در سلولها و بافتها و طی نمودن مراحل تولید گیاه و در عکس العمل آنها در مقابل تنظیم کننده های رشد در محیط مصنوعی با دو لپه ایها تفاوت اساسی دارند و قابلیت کمی برای رشد و تولید تعداد قابل توجهی گیاه کامل در محیط مصنوعی از خود نشان می دهند که علت آن را محدود بودن مناطق مریستمی در این گیاهان ذکر می کنند (ابراهیم زاده ،۱۳۷۱). مهمترین گروه مواد تنظیم کننده رشد گیاهی که عمدتاً در کشت بافت و تکثیر از طریق فلس برداری استفاده می گردند عبارتند از : اکسین ها ، سایتوکینین ها و بندرت جیبرلین ها.

۲,۸,۱. تنظیم کننده های رشد اکسینی

لغت اکسینی یک واژه یونانی است واز "Auxein" به معنی رشد یا بزرگ شدن گرفته شده است و برای اولین بار توسط کوگل[3]، هاگن اسمیت[4]، و ونت[5] برای ماده ی خاصی که موجب ایجاد

---

[1] Dedifferentiation
[2] Redifferentiation
[3] Kogl
[4] Hagen-Smit
[5] Went



خمیدگی در کولئوپتیل یولاف[1] می شود بکار برده شد. اکسین ها گروهی از هورمونهای گیاهی هستند که باعث طویل شدن سلولهای گیاهی می گردند. این مواد طیف گسترده ای از واکنش های رشد و نموی گیاهان را سبب می شوند. مهمترین اثراتی که تاکنون به تنظیم کننده های رشد اکسینی نسبت داده شده اند عبارتند از : بزرگ شدن سلول گیاهی ، طویل شدن ساقه گیاه ، تولید ریشه ، تولید آوند چوبی ، افزایش رشد جوانه رأسی ، جلوگیری از رشد جوانه جانبی ، تشکیل میوه ، بزرگ شدن میوه ، تشکیل گرهک در ریشه گیاهانی که دارای باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن هستند ، جلوگیری از ریزش برگ ، بیوسنتز پروتئین و RNA ، ژئوتروپیسم و فتوتروپیسم ، پارتنوکارپی ، ظهور اندامهای جنسی و ....(Arteca,1996) .

اکسین ها عمدتاً در بخشهای مریستمی گیاه به خصوص جوانه های رأسی و برگهای جوان بیوسنتز می شوند. در مورد اکسین گفته شده است که چون ایندول استیک اسید (IAA) که تنها اکسین ایندولی طبیعی می باشد از نظر ساختمان شیمیایی شبیه به اسید آمینه تریپتوفان است احتمالاً از آن نیز سنتز می شود. پس از شناسایی عناصر رادیواکتیو و به کارگیری برخی از آنها در پژوهشهای بیولوژیک نظریه ی فوق تأیید گردید (فهیمی ،۱۳۷۶) .

۲,۸,۱,۱. انتقال اکسین در گیاه

هورمون اکسین پس از تشکیل در گیاه ممکن است اثرات خود را درهمان محل تولید اعمال نماید و یا در گیاه منتقل شده و در ناحیه ای غیر از محل تشکیل اثرات خود را آشکار سازد . جهت انتقال اکسین در گیاه معمولاً از طرف بالا به پائین یا از نوک ساقه به طرف قاعده است . البته حرکت

[1] *Avena* coleoptil



جانبی اکسین نیز مشاهده گردیده است و گزارشهای چندی نیز مبنی بر حرکت از پائین به بالا اکسین وجود دارد (لاهوتی، حسن آبادی، و احمدیان، ۱۳۸۲) .

انتقال اکسین به دو روش قابل اندازه گیری است :

۱. روش زیست سنجی[1] قطعه تحتانی پس از افزودن IAA به نوک ساقه

۲. استفاده از ^{14}C یا ^{3}H نشاندار موجود در IAA در قسمت فوقانی همراه با کروماتوگرافی و شمارش تشعشعات رادیواکتیو

یکی از فرضیاتی که در انتقال قطبی اکسین بسیار رواج یافته ، فرضیه اسمز شیمیایی است. این فرضیه بیان می کند که سیتوپلاسم سلول برای ثابت نگهداشتن شیب pH از سمت غشاء پلاسمایی به دیواره سلولی بسیار اسیدی است . در pH اسیدی ، اکسین موجود(IAAH) فعال بوده و میتواند با آسانی از طریق انتشار وارد سلول گردد، در داخل سیتوپلاسم اکسین به صورت IAA^- غیر فعال می گردد و نمی تواند به خارج منتشر گردد . هنگامیکه غلظت IAA^- در سلول افزایش می یابد حرکت آن به خارج از سلول به صورت تعادل ترمودینامیک بوده و از طریق ناقل مخصوص IAA^- که در انتهای سلول قرار دارد، انجام می گیرد . جاکوبس وگیلبرت[2] (۱۹۸۳) روش ایمنوفلورسنت غیر مستقیم را همراه با پادتن های منوکلونال[3] را بدین منظور به کار بردند و شواهدی مبنی بر وجود احتمالی ناقل آنیون اکسینی دربافت نخود بدست آورند . آنها نشان دادند که این ناقلین در غشاء پلاسمایی در قاعده انتهایی سلولهای پرانشیمی که دسته های آوندی را احاطه کرده اند، قرار دارند .

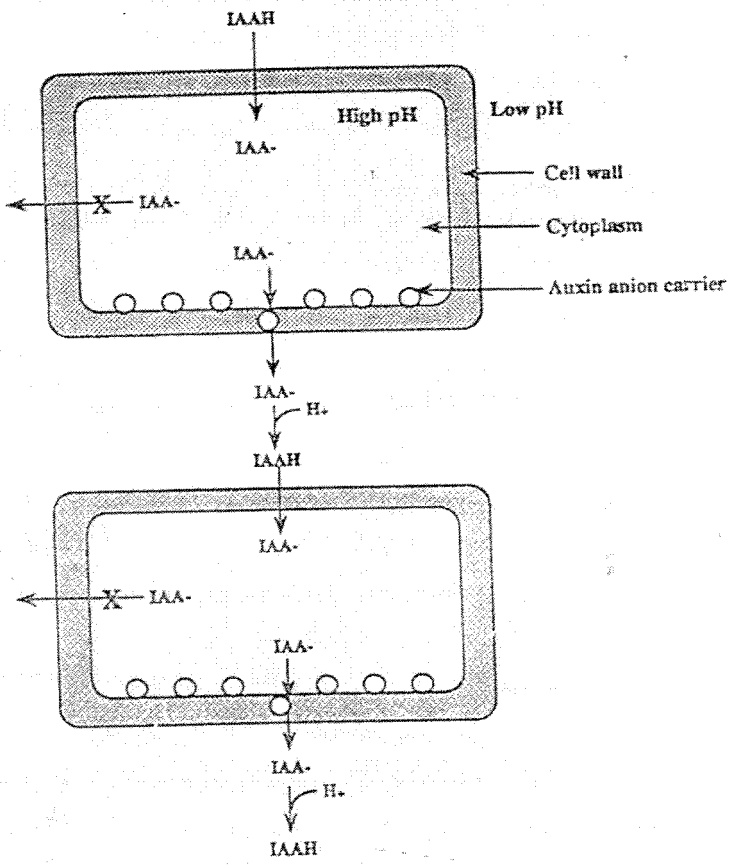
---

[1] Bioassay
[2] Jacobs & Gillbert
[3] Monoclonal antibodies



۲,۸,۱,۲. مکانیسم عمل اکسین

بسیاری از پژوهشگران نشان داده اند که رشد حاصل از اثر القایی اکسین تحت تأثیر ترکیبات بازدارنده سنتز RNA و پروتئین متوقف می گردد؛ ترکیب کلرامفنیکل با همان تراکمی که مانع اثر اکسین بر روی رشد می گردد، مانع سنتز پروتئین نیز می شود . بنابراین ادامه سنتز پروتئینها برای ظهور اثر القایی اکسین بر روی رشد لازم است. در کل اکسین باعث افزایش سنتز RNA و پروتئین شده و این عمل تحت اثر آنتی اکسین ها، خنثی می گردد(Masuda,1968) .



شکل۵-۲ : نمای کلی فرضیه اسمز شیمی در انتقال اکسین (Arteca,1996)

به نظر می رسد اثرات نسبتاً زیاد IAA براین دلالت کند که ممکن است بیش از یک پروتئین یا آنزیم در مکانیسم عمل این تنظیم کننده رشد دخالت داشته باشد. مشخص گردیده که اندول استیک اسید، بزرگ شدن طول سلولها را در کولئوپتیل های گیاهان علفی و بافتهای میانگره ساقه



سرعت می بخشد. این افزایش طولی سلول منحصراً در جهت عمودی (طولی) صورت گرفته و همگام با آن وزن تر آنها اضافه می گردد. افزایش وزن تر عمدتاً نتیجه افزایش جذب آب است (فهیمی،۱۳۷۶). بیشتر مطالعات در این زمینه به وسیله کولئوپتیل ها یا بافتهای قطع شده ریشه ها انجام می گیرد. این بافت ها IAA کمی دارند و زمانی که در معرض IAA خارجی قرارمی گیرند، افزایش رشد را به خوبی نشان می دهند . مراحل طویل شدن سلول بوسیله آب در واکنش به اکسین به صورت زیر خلاصه می شود :

۱. ابتدا مقاومت دیواره سلولی نسبت به گسترش و اتساع کاهش می یابد. این پدیده ناشی از شکست پیوندهای غیر کووالانسی بین گزیلوگلوکان ها و سلولز در دیواره سلولی است.

۲. تغییراتی در روابط آبی داخل سلول ایجاد می شود، حتی اگر پتانسیل سلول تغییر نکند، پتانسیل آب در سلولهای تیمار شده با اکسین در اثر کاهش فشار ، بیشتر منفی می شود.

۳. کاهش پتانسیل آب منجر به ورود آب به سلول شده و فشاری را در جهت روبه بیرون بر دیواره سلول انعطاف پذیر اعمال کرده و باعث طویل شدن آن می گردد.

۴. وقتی طویل شدن سلول کامل گردد، اتصال غیر کووالانسی بین سلولز و پلی ساکارید ها دوباره تشکیل می گردد و این فرآیند برگشت پذیر نیست (Arteca,1996).

مکانیسم های زیادی در مورد چگونگی سست و نرم شدن دیواره سلولی وجود دارد. مشهورترین مکانیسم در این زمینه فرضیه رشد اسیدی[1] می باشد. این فرضیه بیان می کند که اکسین ها باعث می شوند سلولهای کولئوپتیل یا قلمه های ساقه، یون های هیدروژن را به دیواره اولیه ترشح کنند و در ابتدا از میزان pH کاسته شده و باعث نرم شدن دیواره سلولی ودرنهایت رشد سریع آنها گردد؛ احتمالاً کاهش pH ،آنزیم های سست کننده دیواره سلولی را که در حالت عادی در pH بالا غیر

[1] Acid growth hypothesis



فعالند، فعال می سازد (Cleland,1987) . اکسینها بسته به غلظت خود ممکن است اثرات بازدارندگی یا رونق بخشی روی واکنش معینی داشته باشند . مؤثرتربودن یک اکسین نه تنها به غلظت آن ، بلکه به نوع مخصوص فعل و انفعالات و قسمتی که بر روی آن تأثیر می گذارد بستگی دارد . یک اکسین که روی یک نوع فعل و انفعال رشدی بسیار مؤثر است ممکن است روی نوع دیگر اثر نداشته باشد یا اثرش کم باشد .

۲,۸,۱,۳. اکسین های مصنوعی

امروزه اکسین های مصنوعی بسیاری ساخته شده و برای اهداف گوناگون مصرف می شوند . اکسین های مصنوعی ترکیباتی هستند که فعالیت شیمیایی مشابه IAA دارند ولی از نظر ساختمانی شبیه به آن نیستند و به شش گروه تقسیم می شوند :

۱. مشتقات ایندول: ایندول -۳- استیک اسید(IAA) ؛ ایندول -۳- بوتیریک اسید (IBA) .

۲. اسیدهای بنزوئیک : ۲و۳و۶ تری کلروبنزوئیک اسید ؛۲- متوکسی۳ و۶- دی کلروبنزوئیک اسید یا دی کامبا[1]

۳. اسیدهای نفتالین : α و β نفتالین استیک اسید (α و β -NAA)

کلروفنوکسی استیک اسید :۲و۴و۵-تری کلروفنوکسی استیک اسید (2,4,5-T) و ۲و۴-دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)

۴. اسیدهای نفتوکسی استیک : α و β نفتوکسی استیک اسید (α و β - NOA)

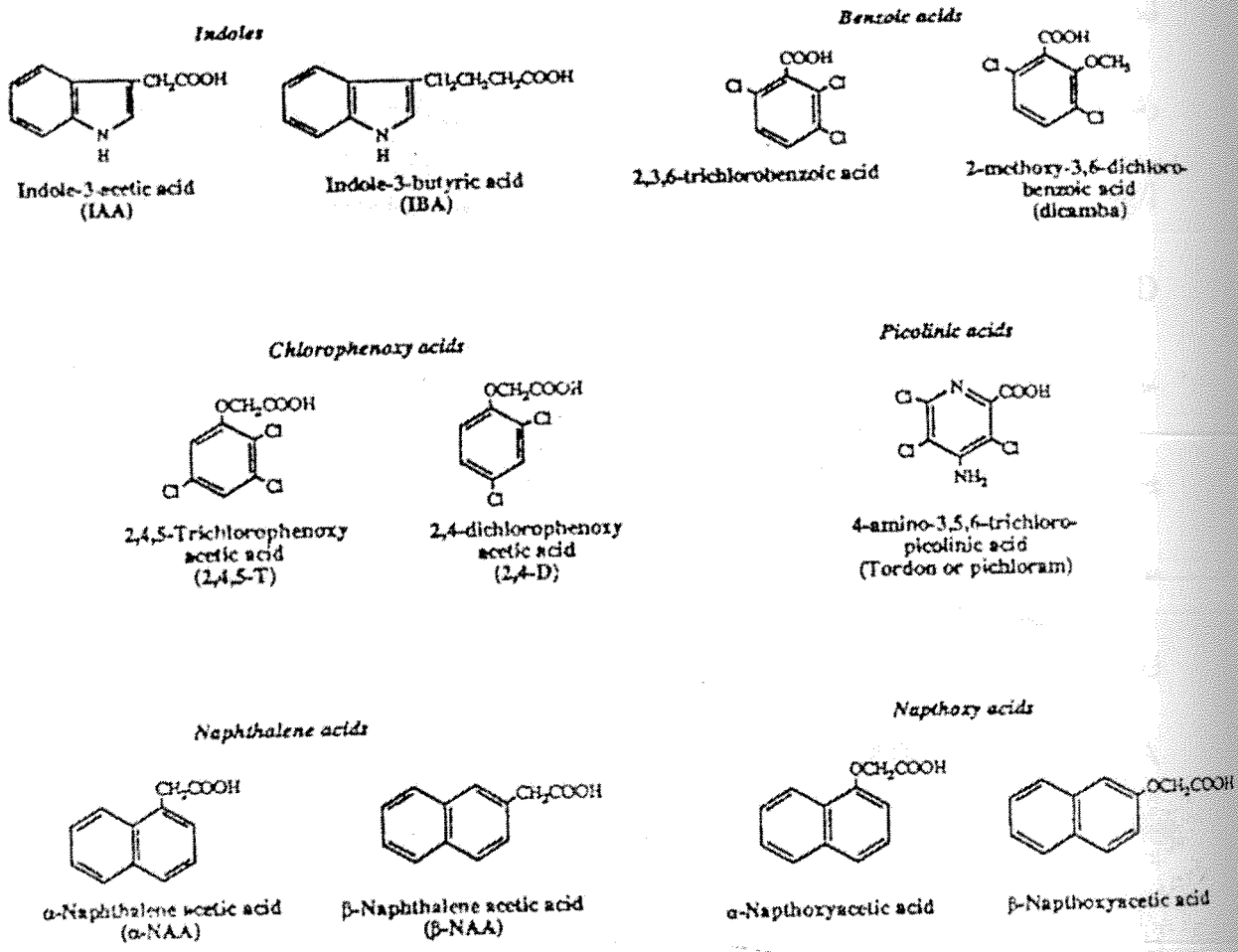
۵. اسیدهای پیکولینیک[2] :۴-آمینو-۳ و۵ و۶ تری پیکولینیک اسید (توردون[1] یا پیکلورام[2]) (Arteca,1996) .

[1] Dicamba
[2] Picolinic acid



از مفیدترین و متداولترین اکسین های مصنوعی که در سال ۱۹۳۵ ساخته شدند می توان IBA و NAA را نام برد . IBA به صورت طبیعی نیز یافت شده است. برخی از تنظیم کننده های رشد گیاهی نیز از فعالیت اکسین جلوگیری می کنند که به آنها آنتی اکسین گفته می شود که عبارتند از :

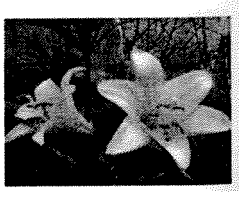
.PCIB , 2,4,6-T , NPA , PTAA ,TIBA



شکل ٦-٢ : فرمول شیمیایی شش گروه ازاکسینهای مصنوعی

اکسین های IAA ، NAA ،2,4-D یا IBA در کشت بیشتر سلولهای گیاهی به منظور تقسیم سلول و انگیزش ریشه لازم هستند . غلظتهای بالای اکسین سبب جلوگیری از ریخت زایی می گردد . از اکسین2,4-D به میزان زیادی برای آغازش پینه استفاده می شود . معمولاً اکسین ها به

[1] Tordon
[2] Pichloram



گرما مقاومند و می توان آنها را C ° ۱۲۰-۱۱۰ به مدت ۱ ساعت حرارت داد . اما IAA در مجاورت pH پائین ، نور، اکسیژن و پروکسیداز تخریب می گردد. NAA و 2,4-D از IAA پایدارترند و مانند این اکسین عمل می کنند (Smith,2000) . NAA یکی از پر مصرف ترین اکسین ها در ریز ازدیادی بوده و مقاوم به تجزیه نوری و حرارتی است. از مزیتهای دیگر NAA شباهت بسیار زیاد فعالیت آن با IAA است . با این تفاوت که در مقادیر بسیار کمتر از غلظت لازم IAA ، باعث ایجاد رشد و تمایز بیشتری در بافتهای کشت شده می گردد. اکسین طبیعی IAA معمولاً در محدوده غلظت mg/l ۱۰-۰/۰۱ به محیط کشت افزوده می گردد. اکسینهای مصنوعی و فعالتر چون IBA , NAA 2,4-D در غلظت mg/l ۱-۰/۰۱ بکار می روند . در غلظتهای کم اکسین تشکیل ریشه های نابجا حالت غالب دارد . در حالیکه در غلظت های زیاد اکسین تشکیل ریشه صورت نمی گیرد و تشکیل پینه اتفاق می افتد. استفاده از 2,4-D باید حتی المقدور محدود شود زیرا می تواند سبب ایجاد موتاسیون گردد. از طرف دیگر 2,4-D می تواند مانع از فتوسنتز گردد(Pierik,1997) . براساس زیست آزمونی انحراف ساقه، 2,4-D تا ۱۴ برابر ، 3,4,5-T تا ۴ برابر، پیکلورام ۲ تا ۴ برابر و NAA ۲ برابر فعالیت IAA را دارد. به طور کلی اکسین ها در محیط کشت بکار می روند تا تولید پینه و رشد سلول را تحریک کرده و موجب آغازش شاخساره و به ویژه ریشه شده و رویانزایی بدنی را برانگیخته و رشد نوک شاخساره را تحریک نمایند (خوشخوی،۱۳۷۳) .

۲,۸,۲. تنظیم کننده های رشد سایتوکینینی

سایتوکینین یک واژه عمومی است که به گروهی از تنظیم کننده های رشد که در تقسیم سلولی مؤثرند اطلاق می گردد. قسمت عمده این ترکیبات از پورین[1] مشتق شده اند و از نظر شیمیایی

[1] Purine



به عنوان N_6 جایگزین در حلقه آدنین هستند. در دهه ۱۹۵۰ در آزمایشگاه اسکوگ[1] فیزیولوژیست آمریکایی بررسیهای بر روی رشد کال در روی بافتهای توتون و ریشه ی هویج صورت گرفت. در این تجربیات مشاهده گردید که در محیط کشت فاقد هورمونهای اکسین که قبلاً به عنوان محرک رشد شناخته شده بودند، هورمون هایی به نام سایتوکینین باعث تحریک رشد کال می گردد. اولین سایتوکنین در سال ۱۹۶۱ از DNA اسپرم شاه ماهی در یک تجربه اتفاقی از یک نمونه DNA که در اتوکلاو قرار گرفته و تخریب شده بود ، بدست آمد (فهیمی،۱۳۷۶) .

اولین سایتوکینین طبیعی از دانه های ذرت نارس جدا شده و زآتین[2] نامیده شد. معمولترین سایتوکینین گیاهان زآتین است . امروزه بیش از ۲۰۰ نوع سایتوکینین طبیعی و مصنوعی شناخته شده است (Matsubara,1990) . سایتو کینین ها درنواحی مریستمی و نواحی دارای پتانسیل رشد زیاد مانند ریشه ها ، برگهای جوان ، میوه های کامل و بذور به مقدار زیاد وجود دارند. به احتمال قوی سایتوکینین ها در ریشه سنتز می شوند و به ساقه انتقال می یابند ، زیرا گزارشهای زیادی مبنی براینکه سایتوکینین ها در شیره آوند چوبی وجود دارند ، منتشر گردیده است. با این حال وجود سایتوکینین ها در میوه و بذر نیز احتمال سنتز سایتو کینین را در این اندامها تقویت می کند (Arteca,1996) .

۲,۸,۲,۱. اثرات فیزیولوژیکی سایتوکینین ها

سایتوکینین ها در کلیه مراحل زندگی گیاه از رویش دانه تا تشکیل دانه مؤثرند . این هورمونها بر روی متابولیسم عمومی گیاه و به ویژه فعالیت آنزیم ها و کوآنزیم های مؤثر در بیوسنتز مواد و رشد گیاه اثر می نمایند. سایتوکینین ها در پیدایش اندامکهای درون سلولی و نقل و انتقال مواد در درون سلول و به طور کلی تمام گیاه مؤثر هستند. سایتوکینین ها مستقیماً بر سنتز RNA , DNA و

[1] Skooge
[2] Zeatin



پروتئین تأثیر می گذارند (فهیمی ،۱۳۷۶) . برخی دیگر از واکنش های بیولوژیکی که توسط سایتوکینین ها فعال می شوند عبارتند از : تقسیم سلولی، اندام زایی ، به تعویق انداختن پیری ، باز و بسته شدن روزنه ها ،تکامل جوانه ها و شاخه ها، انتقال انتخابی مواد غذایی و مواد آلی به بافتهای تیمار شده و . . .(Arteca,1996) .

عمل مهم سایتوکینین ها در گیاهان تحریک تقسیم سلولی است . بافت پینه ای مغز ساقه توتون در واکنش به کینتین[1] یا IAA به تنهایی رشد می کند ولی برای ادامه رشد بافت مغز ساقه ، باید هردو ماده کینتین و IAA در محیط کشت حضور داشته باشند. توضیح مسئله به این صورت است که IAA یا سایتوکینین داخلی موجود در گیاه ممکن است با استعمال خارجی IAA یا سایتوکینین افزوده شده اثر متقابل داشته باشند. با این همه به مرور زمان مقدار مواد داخلی کاسته شده و رشد بیشتری روی نمی دهد. امروزه مشخص شده است که با تغییر نسبت IAA/CK می توان به یکی از اندامهای ریشه ، ساقه و بافت پینه دست یافت . توانایی تولید مجدد گیاهان از بافتهای پینه ای یک روش بیولوژیک است که معمولاً برای انتخاب گیاهان مقاوم به خشکی ، تنش شوری ، عوامل بیماریزا ، علفکش ها و غیره مورد استفاده قرار می گیرد (ابراهیم زاده ،۱۳۷۱). ویکسون وتیمن[2] (۱۹۵۸) نشان دادند که سایتوکینین ها ، جوانه های جانبی قلمه های ساقه نخود را افزایش داده و تا حدودی غالبیت انتهایی ساقه را از بین می برند. مدفورد و همکاران (۱۹۸۹) نیز در آربیدوپسیس[3] مقادیر سایتوکینین را افزایش دادند. در این بررسی، یک ژن باکتریایی رمز گذاری شده با آنزیم ایزوپنتیل AMP سنتتاز[4] (آنزیم مسئول تولید سایتوکینین زآتین) همراه با شوک گرمایی به ژنوم توتون و آربیدوپسیس وارد می شود. این ژن جدید توسط گیاهان حامل در دمای C °۴۵-۴۰ در مدت کوتاهی شروع به فعالیت می کند

[1] Kinetin
[2] Wichkson & Thimann
[3] Arabidopsis
[4] Isopentyl AMP synthethase



که در نتیجه آن میزان زآتین ریبوزید منوفسفات[1] و زآتین ریبوزید به ترتیب ۲۳ و ۴۶ مرتبه افزایش می یابد. گیاهان حامل ژن جدید که سایتوکینین زیادتری تولید می کنند، باعث افزایش تعداد جوانه ها جانبی شده و غلبه انتهایی را از بین می برند. فرضیه دیگر اینکه سایتوکینین ممکن است یک مکانیسم تخلیه را در جوانه های جانبی آغاز نموده و انتقال مواد غذایی ، ویتامین ها ، مواد معدنی و سایر مواد رشد را که همگی ممکن است رشد جوانه های جانبی را محدود کنند، افزایش دهد (Arteca,1996).

۲,۸,۲,۲. مکانیسم عمل سایتوکینین ها

سایتوکینین ها از نظر شیمیایی دارای پایه پورینی هستند که در DNA و RNA وجود دارد . این هورمونها را از بخش های فعال مریستمی گیاه جدا کرده اند یعنی همان محل هایی که بیوسنتز نوکلئیک اسیدها و پروتئین ها به شدت صورت می گیرد. شباهت ساختمانی بسیاری از سایتوکینین ها با آدنین که یک جزء ساختمانی مولکولهای RNA وDNA می باشد موید این نظر است که اثرات اساسی این هورمونها در حد بیوسنتز پروتئینها می باشد. به نظر می رسد که سایتوکینین ها برخی از مراحل متابولیکی را در محل عمل خود در گیاه فعال می سازند و با تغییراتی که در متابولیسم محل عمل خود ایجاد می کنند برخی از مولکولها مانند آمینواسیدها، فسفات معدنی، قندها ومواد محلول دیگری را در این محل جمع می کنند (فهیمی، ۱۳۷۶) .

برخی از سایتوکینین های طبیعی عبارتند از : زآتین ، ایزوپنیتل آدنین یا 2ip و برخی از سایتوکنین های مصنوعی شامل بنزیل آدنین(BAP یا BA) کینتین یا مواد دیگری که فعالیت شبیه به سایتوکینین ها را دارند مثل تیواوره، دی فنیل اوره، تیدیازورون[2](TDZ) و CPPU[1] می باشند

[1] Zeatin riboside monophosphate
[2] Thidiazuron



(Hartmann *et al.* , 1997). سایتوکینین ها معمولاً در محدوده ی غلظت ۱۰-۰/۰۱ mg/l به کار برده می شوند. آنها بازهای ضعیفی بوده و به آسانی در اسید رقیق حل می گردند (Huang and Murashing ,1976). محلول ذخیره CK را می توان تا چند ماه در یخچال نگهداری کرد (Smith,2000).

نوع ریخت زایی که در کشت بافت گیاهی اتفاق می افتد عمدتاً به نسبت غلظت اکسین ها و سایتوکینین های موجود در محیط کشت بستگی دارد. آغازیدن[2] ریشه در گیاهچه ها ، رویان زایی وآغازیدن پینه همگی در صورت زیاد بودن نسبت اکسین به سایتوکینین می باشد. در حالی که پرآوری[3] شاخساره نابجا و جانبی هنگامی انجام می شود که این نسبت کم باشد. غلظت اکسین ها و سایتوکینین ها به اندازه نسبت آنها اهمیت دارد. کاربرد 2,4-D و BA هردو به غلظت مساوی ۵ mg/l تشکیل پینه را در چمن آفریقایی *Agrostis* ترغیب می کند؛ ولی کاربرد همین هورمون ها هر دو با غلظت مساوی ۱ mg/l تشکیل شاخساره را در این گیاه سبب می شود. در هر دو حالت نسبت اکسین به سایتوکینین یکسان است اما به دلیل بالا بودن غلظت اکسین در مورد اول، تشکیل پینه بدون توجه به غلظت سایتوکینین اتفاق می افتد (Torrea, 1989).

براساس تقسیم بندی پیریک (Pierik , 1983) کشتها را می توان بسته به نیازشان به اکسین یا سایتوکینین به ۴ دسته تقسیم کرد :

۱. کشتهایی که به اکسین و سایتوکینین نیازی ندارند .

۲. کشتهایی که فقط به اکسین نیاز دارند .

۳. کشتهایی که فقط به سایتوکینین نیاز دارند .

---

[1] N-2-Choro-Puridyl-N-phenylurea
[2] initiation
[3] Proliferation



۴. کشتهایی که هم به اکسین و هم به سایتوکینین نیاز دارند.

جیبرلیک اسیدها (GA_3) و آبسایزیک اسید (ABA) دو تنظیم کننده رشد دیگری هستند که گاهی در محیطهای کشت به کار می روند. کشت بافتهای گیاهی را معمولاً بدون ABA و GA_3 نیز می توان برای رشد برانگیخت. به طور کلی افزودن GA_3 به محیطهای کشت باعث ترغیب رشد در کشتهای سلولی کم تراکم ، افزایش رشد پینه ، و طویل شدن گیاهچه های کوتاه قد می شود. GA_3 ممکن است برای برطرف کردن رکود[1] بذرها ، جنینهای ایزوله ، یا پیازچه ها به کار برده شود. افزودن آبسایزیک اسید به محیط کشت برای ممانعت از رشد پینه بر حسب گونه گیاهی یا ترغیب آن، افزایش پرآوری شاخساره یا جوانه و جلوگیری از مراحل آخر نمو رویان می باشد (خوشخوی،۱۳۷۳).

به طور کلی عواملی چون تنظیم کننده های رشد ، دما ، نور ، ژنوتیپ ، قند و . . . با یکدیگر و با محیط کشت اثرات متقابلی دارند:

اثر متقابل مواد تنظیم کننده رشد با دما :

بروز تغییراتی در شکل گیری اندامها می تواند بستگی به وجود اکسین یا سایتوکینین درونزا یا برونزا داشته باشد. برخی اوقات غلظت اکسین یا سایتوکینین درونزا شدیداً تحت تأثیر دما قرار می گیرد .

اثر متقابل نور و تاریکی با هورمونها:

تغییر شرایط نوری باعث تغییراتی در متابولیسم هورمونها و نقل وانتقال آنها می شود .

اثر متقابل ژنوتیپ با مواد تنظیم کننده رشد:

[1] Dormancy



برخی ژنوتیپ ها برای رشد و نمو به غلظت های بالا و برخی به غلظتهای پائین مواد تنظیم کننده رشد نیازمند هستند. توانایی بالقوه بیوسنتز یک هورمون خاص غالباً به صورت ژنتیکی کنترل می شود (Pierik, 1997).

۲,۹. مروری بر تحقیقات انجام شده

بررسی های متعددی درباره ی تکثیر گونه های مختلف لیلیوم از طریق فلس برداری و کشت بافت گزارش گردیده است . بیشتر این پژوهش ها اثرات تنظیم کننده های رشد مختلف و سایر شرایط محیطی و فیزیولوژیکی را بر تولید بافت های متعدد از منابع گوناگون مورد بررسی قرار می دهند . چنین مطالعاتی نشان داده اند که لیلیوم های مختلف احتیاج به شرایط متفاوتی دارند و برای درک شرایط بهینه مورد نیاز برای هر گونه و حتی رقم ، آزمایشات مختلفی باید صورت بگیرد؛ به برخی از این آزمایشات در ذیل اشاره می گردد.

۲,۹,۱. تأثیر عوامل مختلف بر فلس برداری لیلیوم

۲,۹,۱,۱. اثر تنظیم کننده های رشد

نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد به عنوان یک عامل اصلی در فرآیند ازدیاد ارقام و گونه های مختلف لیلیوم مورد توجه محققین قرار گرفته است. در آزمایشاتی که بر روی چند رقم لیلیوم : *L. lancifolium* , *L. xelegans* "Connecticut King" ; *L. longiflorum* "Gleria" *L. speciosum* "Stargazer" ; انجام گرفت ، فلس های این ارقام به مدت ۱ ساعت در محلول تنظیم کننده های رشد NAA و IBA به غلظت های ppm ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۳۰۰، ۱۰۰، ۰ خیسانده شدند و به مدت ۳ ماه در انکوباتور و در دمای ۲۵ °C نگهداری گردیدند. سپس تعداد



پیازچه ، وزن تر و قطر هر پیازچه اندازه گیری گردید . نتایج به دست آمده نشان داد که فلس هایی که در تیمار[1] IBA به غلظت ۱۰۰pmm قرار گرفته بودند بیشترین میزان پیازچه را در کلیه لیلیوم های مورد آزمایش تولید کردند درحالی که تیمارهای ppmNAA ۱۰۰ و ۵۰۰ باعث کاهش تعداد پیازچه گردید. همچنین وقتی فلس ها با IBA ppm ۳۰۰ و ۱۰۰ یا NNA تیمار شده بودند ، تعداد و قطر پیازچه ها افزایش یافتند (Park,1996) .

در مطالعه ی دیگری اثر تراماتیک اسید[2] (TA) که نقش یک هورمون را در بافت های زخمی گیاه ایفا می کند و سبب تحریک تقسیم سلولی و تمایز یابی در محل زخم می گردد بر ارقام :

L. lancifolium, *L. longiflorum* "Snow Queen" , *L. x* "Connecticut King", *L. x* "Sunray" مورد بررسی قرار گرفت و فلس های میانی این ارقام به مدت ۱ ساعت در محلول آبی تراماتیک اسید به غلظت µM ۱ قرار گرفتند . نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که ژنوتیپ بر تشکیل پیازچه اثر می گذارد . TA تعداد پیازچه را در هر فلس بین ۲۰٪ تا ۴۰٪ افزایش می دهد و سبب افزایش وزن تر به میزان ۲۰٪ تا ۶۰ ٪ می گردد (Marinangeli and Curveto, 1997a).

در آزمایش دیگری که به منظور تعیین بهترین محیط کشت و تنظیم کننده رشد در تکثیر از طریق فلس برداری لیلیوم انجام گردید، پس از تهیه پیازهای لیلیوم آسیایی "Pollyanna" و لیلیوم شرقی رقم "Star Gazer" تیمار سرمایی به مدت ۱۲ هفته و دمای ۴ °C بر روی آنها انجام شد و سپس در محلول تنظیم کننده های رشد IBA، NAA به غلظت های ppm ۱۰۰ و ۵۰ به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. سپس در بسترهای کشت ماسه ، Solrite و FYM به نسبت ۱:۱:۱ در دمای ۲۰° C قرار گرفتند. پس از ۳ ماه بیشترین تعداد تشکیل پیازچه به میزان ۱۰۰٪ فلس های مورد استفاده رقم 'Pollyanna' در تیمار NAA , IBA ppm ۱۰۰ به دست آمد (Dilta *et al* ., 2000) . در

[1] Treatment
[2] Traumatic acid



آزمایش دیگری تیمار سه نوع اکسین IAA , IBA , NAA به غلظت ppm ۱۰۰۰ بر روی آمار یلیس (*Hippeastrum hybridum*) انجام شد . نتایج نشان داد که تیمار اکسین در این غلظت سبب کاهش تعداد پیازچه در هر فلس دوقلو[1] می گردد که این امر برای پرورش دهندگان که خواستار یک پیازچه در هر فلس دوقلو هستند امری مطلوب می باشد . فلس های داخلی تعداد پیازچه بیشتری تولید کردند. تیمار NAA سبب گردید تا تعداد ریشه ها افزایش یابد و تیمار IBA سبب گردید تا طول ریشه ها در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر شود (Fernando *et al* . ,1994).

۲,۹,۱,۲. اثر رقم در فلس برداری

در مطالعه ای که بر روی شش رقم از لیلیوم عید پاک[2] انجام گرفت ، میزان رشد گیاه، سرعت ظهور برگ، و کیفیت پیازچه های حاصل از فلس برداری مورد بررسی قرار گرفت . نتایج نشان داد پیازچه های دو رقم "Hikari" , "Saeiki No 30" ظهور برگ سریعتری داشتند . تعداد پیازچه های رشد کرده از فلس مادری در ارقام "Hinomoto", "Hikari" از سایر ارقام بیشتر بود . همچنین نوع رشد گیاهان به صورت روخاکی به بیشترین میزان در رقم "Georgia" , "Saeiki No 40" و به کمترین میزان در دو رقم "Uemura" , "Aojiku" انجام گرفت (Matsuo and Arisumi ,1979).

۲,۹,۱,۳. اثر رطوبت ، دما و بستر کاشت

در آزمایشی که برروی پیازهای لیلیوم رقم "Enchantment" انجام گرفت نشان داده شد که قارچ *Pinicillum hirsutum* می تواند از زخم محل جدا شدن فلس از پیاز مادری به داخل

[1] Twin scale
[2] *Lilium longiflorum*



فلس وارد شده و بیماری ایجاد نماید . وقتی فلس ها بلافاصله پس از فلس برداری در شرایط مرطوب نگهداری شوند به میزان بالایی نسبت به این بیماری مقاوم هستند در حالی که فلس های نگهداری شده در شرایط خشک علاوه بر کم شدن ۵٪ از وزن ترشان ، به میزان حدود ۱۰۰٪ نیز بیماری در آنها افزایش پیدا می کند. در شرایط مرطوب ترکیبات فنولیک به خصوص اسید پی کوماریک و اسید فرولیک دیواره سلول در سطح زخم تجزیه می شوند. در دمای ۲۰°C و در شرایط خشکی ۱۵ ساعت پس از زخم زنی پاسخ فوق متوقف می گردد. همبستگی مثبت به دست آمده بین مقاومت و تجزیه ترکیبات فنولیک در سطح زخم این عقیده را تأیید می کند که این پاسخ می تواند به علت نقش دفاعی این ترکیبات بر علیه حمله قارچ ها باشد . بنابراین اجتناب از شرایط خشکی پس از فلس برداری به همراه استفاده از قارچکشها مثل کاپتان می تواند نتایج خوبی بدهد (Robroeck *et al* ., 1987) .

در طی فلس برداری ، ظهور برگها از پیازچه های لیلیوم بستگی به راکد[1] بودن یا نبودن پیازچه های تشکیل شده دارد و تحریک رکورد در پیازچه هایی که جدیداً تشکیل شده اند بستگی به درجه حرارت طی تکثیر دارند (Aquettaz *et al* . , 1990).

در بررسی که روی دو رقم لیلیوم به نامهای , *L. xelegana* "Connecticut King" "Casablanca" انجام شد دماهای ۲۰ °C و ۲۵ °C و ۳۰ ° C تفاوت معنی داری بر تعداد پیازچه های حاصل از هر فلس نداشت ولی قطر پیازچه در رقم "Casablanca" با افزایش دما از ۲۰ ° C به ۳۰°C افزایش یافت . پیازچه های غیر راکد در دمای ۲۰°C در هر دو رقم تشکیل شدند و ۶۹٪ پیازچه ها در تیمار ۲۵ °C و ۱۰۰٪ پیازچه های در تیمار ۳۰ °C راکد ماندند. فعالیت مواد شبیه ABA در فلس هایی که در دمای ۲۵ °C یا ۳۰ °C نگهداری شده بودند از تیمار ۲۰ °C بیشتر بود ولی فعالیت مواد شبه جیبرلینی در فلس های نگهداری شده در ۲۰ ° C از تیمارهای ۲۵ ° C و ۳۰°C

[1] Dormant



بیشتر بود . همچنین همین ارقام در بسترهای کشت مختلف شامل ترکیب ورمیکولیت ، پرلیت، پیت خزه به نسبت ۲:۲:۱ و یا هر کدام از این بستر ها به تنهایی در دماهای فوق قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هر دو رقم در بستر پیت خزه در دماهای ۲۰ °C و ۲۵ °C نسبت به سایر بسترهای کشت، تعداد پیازچه و طول ریشه افزایش بیشتری پیدا کرده است . در رقم "Casablanca" دردمای ۳۰ °C ریشه تشکیل نگردید (Suh and Lee, 1996) .

۲,۹,۱,۴. اثر تغییرات فصلی بر ظهور برگ

تحقیقی روی ظهور برگ طی فلس برداری در رقم "*L. longiflorum* "Hinomoto انجام گردید و سطح هورمونهای داخلی که باعث تحریک رکورد در پیازچه ها می شود مورد بررسی قرار گرفت. اگر عمل فلس برداری در زمان گلدهی در خرداد انجام گیرد از ظهور برگ جلوگیری می شود؛ در این زمان فعالیت آبسایزیک اسید بالا است . نتایج حاکی از آن بود که رکورد پیازچه ها در این زمان اتفاق می افتد . در طی یکسال تعداد پیازچه های تولید شده در هر فلس بین ۱ تا ۲/۳ تغییر کرد. کمترین پیازچه ها طی ماههای اردیبهشت تا آبان و بیشترین پیازچه ها در ماههای آذر تا فروردین به دست آمدند. وقتی فلس برداری در ماه آذر صورت گرفت، پیازچه های تشکیل شده ۱۰۰٪ و در ماه دی ۹۰٪ ظهور برگ داشتند اما در ماه بهمن این میزان به ۳۰٪ رسید و کمترین آن در ماههای اسفند و فروردین بود. همچنین بیشترین فعالیت اکسین در ماه آذر و دی بود و به کمترین میزان در ماه فروردین رسید. در مقابل فعالیت اسید آبسایزیک به طور چشمگیری در ماههای فروردین و اردیبهشت افزایش یافت (Okubo *et al* ., 1988).

مطالعه ای بر روی ۵ رقم مختلف لیلیوم انجام گرفت و پیازچه های حاصل از کشت بافت با پیازچه های حاصل از فلس برداری و پیازچه های هوایی مقایسه شدند . نتایج حاکی از آن بود که



پیازچه های حاصل از کشت بافت ضعیفتر بوده و بقای کمتری را پس از کشت در خاک از خود نشان دادند . همچنین رشد آنها به صورت درون خاکی بوده و دیرتر به اندازه ی مناسب برای گلدهی رسیدند. حداکثر رشد نیز در پیازچه های حاصل از فلس برداری به دست آمد (Marinangeli and Curveto, 1997a).

۲،۹،۲. اثر عوامل مختلف بر کشت بافت

۲،۹،۲،۱. اثر تنظیم کننده های رشد

از زمانیکه اسکوگ و میلر[1] گزارش کردند که تمایزیابی اندامهای نابجا در کشت پینه با تعادل بین اکسین و سایتوکینین مورد استفاده در محیط کشت کنترل می گردد دانشمندان زیادی گزارشاتی را دال بر وقایع مشابه در تعداد وسیعی از گونه های گیاهی مشاهده کرده اند. اکنون به خوبی مشخص گردیده که فرآیند باززایی می تواند توسط کاربرد تنظیم کننده های رشد خارجی کنترل گردد. گونه های مختلف و حتی ارقام یک گونه نیازهای متفاوتی به این تنظیم کننده های رشد نشان داده اند و گزارشهای فراوانی نیز حاکی از اثر رضایتبخش نسبت های مختلف اکسین به سایتوکینین در قابلیت باززایی و کیفیت تولید پیازچه در لیلیوم ها موجود می باشند که در ذیل به برخی از آنها اشاره می گردد.

در آزمایشی اثر سایتوکینین BA بر فعالیت جوانه های جانبی *L. pyreaicium* و یک دورگه آسیایی با استفاده از جوانه های نابجای ساقه به عنوان ریز نمونه مورد مطالعه قرار گرفت. تولید بهینه جوانه ها یعنی ۱ تا ۵ جوانه جانبی توسط غلظت های ۲ تا ۸ میلی گرم بر لیتر BA بر روی محیط کشت MS به دست آمد . مشاهدات نشان داد که پرآوری شاخساره از گونه های *L. longiflorum*

[1] Skoog and Miller



و *L. pyreaicium* هنگام بکارگیری قطعات برگ به عنوان ریز نمونه با کاربرد اکسین و سایتوکینین تسهیل می گردد. به علاوه از هر قطعه ساقه که بر روی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۰/۵ تا ۱ میلی گرم در لیتر BA قرار گرفته بود در حدود ۱۰ پیازچه تولید گردید (Hussey,1977).

در مطالعه ای که بر روی یک رقم لیلیوم عید پاک به نام "Ace" انجام گرفت ، مقطعی به ضخامت یک میلیمتر از فلس های آن بر روی محیط کشت LS که بدان تنظیم کننده های رشد گوناگونی افزوده شده بود ، قرار داده شد. نتایج نشان داد که 2ip به تنهایی یا 2ip با NAA هیچکدام در تشکیل پیازچه به اندازه NAA به تنهایی مؤثر نبودند . ترکیبی از 2,4-D و kin یا NAA و Kin در باززایی گیاهک ها مؤثر نبودند (Stimart and Asher , 1978).

به منظور تکثیر از طریق کشت بافت مطالعاتی بر روی اثر غلظت های مختلف NAA , 2ip , BA , بر رقم "Rubrum No 10" *L. speciosum* انجام گرفت . نتایج نشان دادند که NAA به میزان ۱ mg/l و ۰/۱ سبب افزایش تعداد پیازچه در هر ریز نمونه فلسی می گردد. غلظت های ۰/۱ mg/l ، ۰/۰۵ ، ۰/۰۱ ، ۰ سایتوکیتین های BA و 2ip اثر معنی داری بر باززایی پیازچه ها نداشتند ولی سبب رشد غیر عادی پیازچه ها شده و پیازچه های سبز رنگ با دیواره ی نازک را تولید کردند. اثرات متفاوت BA بر تشکیل گیاهچه ممکن است به علت تفاوت های فیزیولوژیکی ، مراحل رشدی ، سن برگها و فلس ها به عنوان ریزنمونه ، و متفاوت بودن ژنوتیپ باشد . انبار کردن پیازهای همین گونه در ۰°C به مدت ۱۲ ماه سبب کاهش نیاز به NAA گردید. در آزمایشی که پس از این تیمار بر روی این گونه انجام گرفت، میزان NAA مورد نیاز برای باززایی بهینه از ۰/۱ mg/l به ۰/۰۵ mg/l کاهش پیدا کرد (Van –Aartrijk and Blom – Barnhoorn,1981).



مطالعه ای بر روی تأثیر تنظیم کننده های رشد بر کشت بافت گونه *L. rubellum* انجام گردید و اثرات BA , NAA در غلظت های مختلف بررسی شد . نتایج نشان دادند که افزودن تنظیم کننده های رشد سبب کاهش درصد باززایی به خصوص در غلظت های NAA ۱ mg/l ، ۰/۵ گردید. افزودن BA اثر اندکی بر افزایش تعداد پیازچه ها داشت. بیشترین وزن تر پیازچه ها در تیمار NAA ۱ mg/l در ترکیب با BA ۰/۱ mg/l بدست آمد که در این تیمار تعداد پیازچه ها در هر فلس از تیمار شاهد کمتر بود. همچنین نتایج حاکی از آن بود که غلظتهای NAA $^{-1}$ ۰/۱ mgl و ۰/۰۵ برای تولید رضایتبخش پیازچه ها مطلوب هستند (Niimi,1985) .

آزمایشاتی به منظور تعیین اثر تنظیم کننده های رشد NAA و BA بر روی رقم *L. x* "Sonnentiger" انجام گردید. نتایج نشان داد که غلظت NAA ۰/۱ mg/l و غلظت ۰/۱ mg/l سایتوکینین هایی چون 2ip و BA بیشترین تعداد پیازچه را تشکیل دادند. بیشترین وزن تر پیازچه ها نیز در تیمار 2ip ۰/۳ mg/l و ۰/۱ یا kin ۳ mg/l به دست آمد. همچنین بهترین ریشه دهی در تیمار NAA ۰/۱ mg/l حاصل گردید (Dabrowski *et al* ., 1992).

مطالعه ای به منظور تعیین اثر تنظیم کننده های رشد و شرایط محیطی بر تکثیر از طریق کشت بافت گونه *L. japonicum* Thunb انجام گردید. ریزنمونه های فلسی این گونه بر روی محیط کشت MS با تیمار NAA و سایتوکینین هایی چون BA , 2ip , kin , zeatin یا ترکیبی از آنها در شرایط تاریکی یا روشنایی و در دمای ۲۰°C یا ۲۵ °C قرار گرفتند. 2ip در مقایسه با سایر سایتوکینین ها در°C ۲۰ و روشنایی مداوم بیشترین درصد باززایی را نشان داد. تیمار NAA ۰/۰۱ mg/l نتایج مشابهی داشت. تیمار شاهد که فاقد تنظیم کننده های رشد بود باززایی خوبی از خود نشان داد. این پاسخ خصوصاً در تیمار روشنایی بهتر بود. غلظتهای بالاتر سبب کاهش باززایی پیازچه ها گردید. زآتین ضعیفترین نتایج را نشان داد. بیشترین تعداد پیازچه ها در هر ریزنمونه



در تیمار NAA mg/l ۰/۱ و 2ip mg/l ۰/۱ در تاریکی و دمای ۲۰°C به دست آمد. پیازچه های باززایی شده در ۲۰°C و روشنایی از تیمار تاریکی بیشتر بودند در حالی که در ۲۵ °C این وضعیت برعکس بود. تعداد پیازچه های دارای ریشه و برگ نیز در ترکیب اکسین و سایتوکینین بیشتر از هر کدام از آنها به تنهایی بود. (Maesato *et al* . , 1994) .

در گونه *L. amabile* بهترین نتایج در تیمار NAA ppm ۰/۰۱ در ترکیب با BA ppm ۰/۰۱ به دست آمد و غلظت های بالا سبب جلوگیری از نمو پیازچه ها گردید و تشکیل پینه را افزایش داد. در گونه *L. callosum* در کلیه تیمارها به خصوص در تیمار حاوی ppmNAA ۰/۱ و ppmBA ۰/۱ پینه به فراوانی تولید شد (Jeong,1996). به منظور ایجاد رویان زایی بدنی در کشت ریزنمونه های فلسی لیلیوم درمحیط کشت MS از تنظیم کننده های رشد BA و 2,4-D به غلظت های µM ۰/۵ تا µM ۵ و به منظور اندام زایی مستقیم از ریز نمونه ها از NAA و BA استفاده گردید (Bach *et al* ., 2000) .

۲،۹،۲،۲. اثر بخشهای مختلف فلس

در مطالعه ای که به منظور تکثیر گل لیلیوم گونه *L. speciosum* انجام گرفت، پرآوری[1] و تمایزیابی ریزنمونه های فلسی به صورت خود به خودی در کشت درون شیشه ای انجام گرفت. همچنین پرآوری در نقاط مختلف فلس متفاوت بود بدین ترتیب که قطعاتی که از قسمت نزدیک به صفحه پایگاهی[2] برداشت شده بودند در مقایسه با قطعاتی که از قسمت دورتر از صفحه پایگاهی برداشت شده بودند، پرآوری بیشتری داشتند. پرآوری به ۱۶- ۱۵ هفته وقت نیاز داشت و تمایز از ناحیه زیر اپیدرمی فلس ریزنمونه منشأ می گرفت (Robb,1957).

[1] Proliferation
[2] Basal plate



در بررسی که به منظور تکثیر گل لیلیوم عید پاک رقم "Ace" انجام گرفت نتایج آزمایش نشان داد که NAA به تنهایی می تواند گیاهک هایی را از پائین فلس برانگیزد. در حالی که NAA و 2ip برای انگیزش گیاهک ها از بخشهای بالایی فلس لازم بودند. همچنین در بررسی دیگری پیازچه های بزرگتر و بیشتر از قطعات ریز نمونه های حاصل از بخشهای پایین فلس به دست آمد. به علاوه ریزنمونه های کوچکتر پیازچه های بیشتری تولید نمودند و ریزنمونه های پایینی فلس پینه بیشتری از ریزنمونه های بالایی فلس ایجاد کردند (Stimart and Ascher , 1978).

در آزمایشی که به منظور ریز ازدیادی گونه *Lilium japonicum* انجام گردید، مشخص شد فلسهایی که به چهار قطعه تقسیم شده بودند تقریباً به اندازه فلس کامل در کشت بافت پیازچه تولید کردند (Asao et al ., 1992). در بررسی دیگری که به منظور تکثیر و استقرار پیازچه های حاصل از کشت بافت همین گونه از بخش های مختلف فلس و همچنین فلس کامل در محیط کشت پایه MS به همراه ۰/۱ mg/l NAA و ۰/۰۱ mg/l BA انجام گردید ، نتایج نشان داد که قطعات تحتانی ریز نمونه ۲/۲ پیازچه تولید کردند در حالی که ریز نمونه های قطعات میانی ۱ پیازچه و ریز نمونه های قطعات انتهایی فقط ۰/۳ پیازچه تولید کردند ضمن اینکه وزن پیازچه های حاصل از ریز نمونه قطعات تحتانی بیشتر بود (Niimi , 1995).

در مطالعه ای که بر روی رقم"Partheneion" *L. concolor* انجام گردید فلسها به صورت عرضی به سه قسمت مساوی بخش های انتهایی ، میانی و تحتانی تقسیم گردیدند. هر قسمت بر روی محیط کشت MS حاوی یا فاقد تنظیم کننده های رشد NAA و BA در زیر نور قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که بدون مواد تنظیم کننده رشد بهترین نتایج از بخش های تحتانی فلس بدست آمد و هیچ پیازچه ای از قسمت انتهایی فلس حاصل نگردید. ولی در حضور ۰/۰۱ mg/l NAA و ۰/۱ mg/l BA بخش های انتهایی، اندامهای بیشتری را تشکیل دادند (Jeong, 1996).



۲،۹،۲،۳. اثر تیمارهای نوری

برخی از اثرات محیطی می توانند بر رشد و نمو گیاهان پیازی تأثیر بگذارند اما مهمترین آنها نور و دما هستند. هرچند که مطالعات گسترده ای بر روی تأثیر دما در رشد و نمو گیاهان پیازی در کشت درون شیشه ای انجام گردیده ولی درمورد اثرات نور بر رشد و نمو گلهای پیازی مطالعات کمی تا کنون صورت گرفته است. شرایط نوری در نمو گیاهان خصوصاً در پیازدهی و گلدهی تأثیر می گذارد (Bach *et al* ., 2000). در آزمایشی که بر روی رقم "Ace" گونه لیلیوم عید پاک[1] در محیط کشت LS انجام گرفت پیازهای بزرگتر و بیشتر هنگام نگهداری کشت ها در تاریکی حاصل گردید اما برگ ها تعدادشان کمتر و اندازه آنها کوچکتر گردید. کشت های نگهداری شده در زیر نور، کاهش مشخصی در تعداد و اندازه فلس ها نشان دادند اما تشکیل برگها و ریشه در آنها افزایش یافت (Stimart and Asher , 1978).

انکوباسیون در نور به طور کاملاً مشخصی تعداد پیازچه هر فلس پیازی و تعداد ریشه ها و برگ های هر پیازچه را افزایش داد؛ به علاوه ظهور برگ و رشد آن فقط در تیمارهای روشنایی انجام گرفت. چنین پاسخ تحریکی به نور و ظهور برگ به وسیله دانشمندان دیگر نیز در سال ۱۹۷۹ گزارش گردیده بود (Leshem *et al*., 1982).

در مطالعه ای که بر روی رقم "Sasa – Yuri" *L. japonicum* انجام گرفت نشان داده شد که احتمالاً تیمار نوری سبب می گردد تا لایه خارجی پیازچه ها محکمتر شده و در نتیجه به تنش آبی مقاومت نشان داده و به عوامل بیماریزا نیز مقاومتر شوند. این دلالت بر این دارد که نور تغییرات مورفولوژیکی در گیاه را نیز سبب می شود. از طرفی پیازچه هایی که در تاریکی کشت شده بودند در زمان انتقال به زمین وزنشان تا ۴۰۰ mg نیز رسیده محور ساقه را پس از کشت تولید کردند. این نشان

[1] Easter lily



می دهد که شرایط تاریکی برای رشد برون خاکی مناسبتر می باشد . در این بررسی توصیه گردیده که پیازچه ها تا زمان رسیدن به وزن ۴۰۰ mg در تاریکی کشت شوند و متعاقب آن به مدت چند هفته قبل از انتقال به خاک، به تیمار روشنایی منتقل گردند (Niimi,1995) .

در بررسی که به منظور مطالعه اثر نور یا تاریکی بر روی رقم *L. concolor* "Parthenion" انجام گرفت درصد پیازچه های تشکیل شده در هر ریزنمونه ، تعداد پیازچه در هر فلس و قطر پیازچه در تیمار روشنایی از تیمار تاریکی بیشتر بود ولی میانگین وزن تر آنها تفاوتی نداشت (Jeong , 1996). آزمایشی برای تعیین اثر نور بر باززایی گیاهچه حاصل از پینه گونه *L.regal* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پینه این گونه دارای قابلیت باززایی بالایی می باشد و در این گونه میزان رویان زایی بدنی به ۱۰٪ می رسد. هنگامی که پینه در طی تکثیر ابتدا در تاریکی نگهداری شده و فقط قبل از باززایی به روشنایی منتقل گردد قابلیت تولید گیاهچه نیز بیشتر می گردد (Pelkonen and kauppi , 1999) .

به منظور تکثیر از طریق رویانزایی بدنی در محیط کشت حاوی 2,4-D و BA از نور با طیف های مختلف چون سفید (۳۶۰-۷۶۰nm) ، نور مادون قرمز(۷۷۰-۸۰۰nm) ، قرمز (۶۴۷-۷۷۰nm) ، زرد (۵۵۰-۵۸۸nm) ، سبز(۴۹۲-۵۵۰nm) ، آبی(۴۵۰-۴۹۲nm) و اشعه ماوراءبنفش (۳۶۰-۴۵۰nm) استفاده گردید. وزن تر پینه و تعداد جنین های بدنی یا پیازچه های نابجا و میزان کلروفیل های a و b اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که کیفیت نور بررشد و نمو بافت های جنینی، بستگی به مرحله اندام زایی بدنی دارد. تاریکی ، نور قرمز و زرد سبب تحریک تشکیل پینه و باززایی به علاوه بالغ شدن رویانهای بدنی می گردد. نور آبی و اشعه ماوراء بنفش سبب ایجاد پیازچه های کوچکتر می شوند. نور آبی همچنین سبب کاهش میزان رکود بوسیله کاهش میزان ABA می گردد



و میزان آنتوسیانین را بالا می برد. نورهای آبی و اشعه ماوراءبنفش تولید کلروفیل a , b را افزایش می دهند (Bach *et al* ., 2000).

۲,۹,۲,۴. اثر دما

دما می تواند اثر فوق العاده ای بر روی رشد و نمو پیازچه های انواع گونه های لیلیوم داشته باشد. مطالعه ای به منظور تعیین اثر دما بر جذب قند ، تجمع نشاسته و تنفس و بزرگ شدن پیازچه ها بر روی گونه *L. japonicum* انجام شد. ریز نمونه ها در دماهای ۱۵° C، ۲۰° C یا ۲۶° C به مدت سه ماه کشت شدند . نتایج نشان داد که درصد قهوه ای شدن فلسها در دمای ۲۶ ° C بیشتر از ۲۰ °C بود ولی پیازچه هایی که در دمای ۲۶ ° C حاصل شده بودند بزرگتر و سنگینتر شدند؛ تشکیل ریشه در دمای ۲۶ ° C کاهش یافت. نتایج نشان داد که دما می تواند بر میزان نشاسته تأثیر بگذارد؛ در دمای ۲۰ ° C میزان کمتری ساکارز در محیط کشت باقی ماند که دلالت بر جذب بیشتر قند نسبت به دماهای ۱۵ ° C یا ۲۶ ° C دارد. همچنین اکسیژن بیشتری در دمای ۲۶ ° C نسبت ۲۰ ° C جذب گردیده بود که نشانگر تنفس بیشتر در دماهای بالا درزمان کشت می باشد (Yamagishi,1998) . در بررسی که بر روی رقم "Stargazar" انجام گردید ، نشان داده شد که رژیم حرارتی به مدت ۸ تا ۱۲ هفته در دمای بالای ۲۵ ° C و متعاقب آن یک دوره کوتاه ۲ تا ۴ هفته ای در دمای متوسط ۱۵ ° C به منظور تشکیل ساقه امری ضروری است. پیازچه هایی که در دمای ۲۵° C و ۱۵ ° C کشت گردیده بودند پس از ۱۶ هفته ساقه تولید کردند ولی وقتی پیازچه ها از ریزنمونه هایی که به مدت ۱۲ هفته در دمای ۲۵ °C نگهداری شده بودند جدا شده و دورن کاغذ صافی مرطوب به مدت ۴ هفته در دمای ۱۵ ° C نگهداری شدند هیچ ساقه ای تشکیل نشد. (Langens- Gerrits *et al* ., 1997).



۲,۹,۲,۵. اثر محیط کشت و ساکارز

شرایط محیط کشت می تواند رشد و نمو پیازچه های حاصل از کشت بافت را افزایش دهد و گیاهانی تولید کند که طی دوره کوتاهتری به اندازه تجاری و گلدهی برسند. چندین مقایسه بین کاربرد محیط کشت مایع[1] و نیمه جامد برای کشت یاخته های لیلیوم انجام گرفته است. در بررسی که بدین منظور انجام گرفت کشتهایی که بر روی آگار قرار گرفته بودند بدون توجه به حضور یا فقدان IAA گیاهچه تولید کردند ولی کشتهای مایع به ندرت گیاهچه تولید کردند در حالی که کشت متراکم بدون توجه به میزان IAA تولید شمار زیادی گیاهچه نمود (Sheridan,1968) .

اثرات پنج نوع محیط کشت رویان[2] بر روی رشد رویان های جدا شده از تلاقی[3] سازگار گونه *L .longiflorum* با *L. x* "Damson" مورد بررسی قرار گرفت. رویان های این تلاقی ها ۳۵ تا ۵۰ روز پس از گرده افشانی جدا شدند و در محیط کشت MS قرار گرفتند. نتایج نشان داد که لازمه رشد بیشتر انتقال رویان به محیط کشتی است که فقط حاوی عناصر پر مصرف ، آهن و یک کربوهیدرات باشد (Stimart and Ascher , 1978). به منظور مطالعه غلظت مناسب ساکارز در باززایی از طریق پینه برخی گونه های لیلیوم ، آزمایشی بر روی گونه های *L. longiflorum* ,*L. formosanum* و برخی هیبریدهای شرقی و آسیایی دیگر انجام گرفت. بهترین غلظت ساکارز برای این دو گونه به میزان ۳٪ بدست آمد اما هیبریدهای شرقی و آسیایی دیگر در غلظت ۳٪ ساکارز به علاوه ۳٪ سوربیتول پاسخ بهتری دادند. همچنین در محیط کشت مایع غلظت ۱٪ ساکارز نسبت به غلظت ۳٪ نتایج بهتری را نشان داد (Okazaki *et al* ., 1994).

[1] Liquid culture
[2] Emryo
[3] Hybridization



در آزمایش دیگری پیازچه های حاصل از ریز نمونه های فلسی رقم لیلیوم "Enchantment" که در محیط MS تولید شده بودند به محیط کشت MS با غلظت استاندارد یا محیط MS با نمک های به میزان دو برابر استاندارد و مقادیر مختلف ساکارز به میزان ۱۲۰ g/l، ۹۰، ۶۰، ۳۰ منتقل گردیدند. سپس کشتها در تاریکی و دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. پس از ۳ ماه اندازه پیازچه ها و میزان رشد آنها اندازه گیری گردید که در محیط حاوی دو برابر غلظت نمک های MS به اضافه ساکارز به میزان ۹۰ gr/l بهترین نتیجه به دست آمد (Marrinangeli and Curveto , 1997 b). در مطالعه که بر روی رقم "Pathenion" *L. concolor* انجام گردید تأثیر درصدهای مختلف ساکارز از ۱٪ تا ۹٪ بر تشکیل پیازچه ، تعداد پیازچه در هر فلس ، میانگین وزن تر هر پیازچه اندازه گیری شد. بالاترین میانگین وزن تر و بیشترین قطر پیازچه ها در میزان ساکارز بیش از ۳٪ بدست آمد؛ حداکثر تعداد پیازچه در غلظت ۶٪ ساکارز حاصل گردید . غلظت های بالاتر ساکارز سبب تأثیر نامطلوب بر پتانسیل اسمزی فلس ها شده و از تمایزیابی و رشد فلسها جلوگیری می کرد (Jeong, 1996) .

در تحقیقی که بر روی اثر افزایش غلظت ساکارز و نمک های محیط پایه MS بر روی بهبود رشد پیازچه های حاصل از ریزازدیادی یک رقم از هیبریدهای آسیایی لیلیوم به نام "Enchantment" *Lilium cv.* انجام گردید نتایج نشان داد که افزایش وزن تر پیازچه ها به شدت تحت تأثیر غلظت ساکارز در محیط کشت است و در غلظتهای ۸۰ gr/l و ۶۰ ساکارز نتایج بهتری بدست می آید. بهترین ترکیب نیز غلظت دو برابر محیط کشت پایه MS به اضافه غلظت های بین ۶۰ تا ۱۲۰ gr/l ساکارز بود(Marinangeli and curvetto , 1997 b).



۲,۹,۲,۶. اثر نوع و اندازه ریز نمونه

در آزمایشی به منظور تکثیر لیلیوم از طریق کشت بافت از ریز نمونه های برگ ، ساقه ، گلبرگ و تخمدان استفاده شده است نتایج این آزمایشات نشان داد که فلس های پیاز ریز نمونه های خوبی هم برای تکثیر در شرایط درون شیشه ای و در محیط عادی در شرایط برون شیشه ای هستند.

اشتنبرگ و همکاران (Stenberge *et al* ., 1977) تشکیل بهینه پیازچه را از پهنک برگ *L. longiflorum* "Nellie White" هنگامی بدست آوردند که ریز نمونه های حاصل روی محیط MS حاوی ۱۰ mg/l NAA و ۱ mg/l kin کشت شده بودند. رویش پیازچه ها در پایین ریز نمونه های برگی به میزان یک تا سه پیازچه صورت گرفت و شمارش کروموزومی نشان داد که گوناگونی کروموزومی اتفاق نیفتاده است. مطالعات بافت شناسی نشان داد که سلول های رویانی در پایین برگ از سر آغازه های جوانه[1] ، ۱۵ روز پس از کشت تشخیص داده می شوند. در آزمایش دیگری مشخص شد که تشکیل اندام تحت تأثیر سن فیزیولوژیکی ریز نمونه قرار دارد. به طوری که اندام زایی و رشد پیازچه های حاصل از فلس های پیازی که سه هفته از تشکیل شان گذشته بود به میزان بالایی صورت پذیرفت و پینه تشکیل ندادند در حالیکه فلس های پیازی مسن پینه تولید کردند ولی پیازچه تشکیل نداند (Takayama and Misawa , 1980) .

در برخی موارد باززایی اندامهای نابجا در کشت بافت حاصل از فلس های پیازی، به صورت غیر مستقیم از پینه صورت می گیرد؛ به علاوه به منظور تولید گیاهان عاری از ویروس از کشت مریستم انتهایی استفاده گردیده است . (Panizza *et al* ., 1990). مطالعه عوامل مؤثر بر تشکیل جوانه نابجا از ریزنمونه های فلسی گونه *L. speciosum* نشان داد که ارتباطی بین تولید اتیلن درونی و مراحل تمایزیابی وجود دارد (Van Aartrijk *et al* ., 1981). در بررسی که بر روی لیلیوم عید پاک

[1] Bud primordia



انجام گردید مشخص شد که تکثیر از طریق فلس های پیازی دارای مزایای بیشتری نسبت به تکثیر از طریق پینه می باشد. زیرا در تکثیر از طریق پینه گوناگونی ژنتیکی حاصل می گردد و پتانسیل باززایی پینه کم است (Priyadarshi and Sin , 1992).

در مطالعه دیگری ریزنمونه های فلسی گونه *L. speciosum* به مدت ۱۲ هفته در تاریکی و دمای ۲۵° C و سپس به مدت چهار هفته در دمای ۱۵° C نگهداری شدند و بعد از آن به مدت ۱۰ هفته در دمای ۵° C تیمار سرمایی دیدند. یکی از عواملی که برروی تشکیل ساقه در پیازچه ها تأثیر داشت اندازه ریز نمونه بود. به طوریکه وزن خشک پیازچه های باززایی شده از ریز نمونه ۱۲ mm × ۳ در حدود دو برابر وزن خشک پیازچه های حاصل از ریز نمونه های ۶ mm ×۳ بود. هر چه پیازچه های تولیدی بزرگتر باشند احتمال تشکیل ساقه در آنها بیشتر است به طوریکه پیازچه های حاصل با وزن کمتر از ۱۵۰ mg هرگز ساقه تشکیل ندارند در حالیکه ۷۰٪ پیازچه های بزرگتر از ۳۰۰mg توانستند ساقه تشکیل دهند(Langens – Gerrits *et al* ., 1997). در مطالعه ای که بر روی رقم "Sasa-Yuri" *L. japonicum* انجام گردید ، ریز نمونه های برگ و ساقه و فلس به منظور تکثیر از طریق کشت بافت استفاده گردیدند. نتایج حاصل نشان داد که گرچه ریز نمونه های برگی دارای میزان آلودگی بسیار کمتری در محیط های کشت می باشند ولی پیازچه های حاصل از ریزنمونه های فلسی وزن بیشتری را نسبت به سایر ریزنمونه ها نشان دادند. به طور کلی نتایج نشان داد ریز نمونه های فلسی مواد اولیه مناسبی برای استقرار در محیط کشت بافت هستند (Niimi , 1995).

۲,۹,۲,۷. اثر پروتئین و پلی آمین ها

پلی آمین ها از جدیدترین هورمونهای گیاهی هستند که اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط پروفسور گالستون به عنوان هورمون طبقه بندی شدند. این هورمونها در بسیاری از فرآیندهای گیاهی به



خصوص تقسیم سلولی و تغییرات مرفولوژیکی گیاه دخالت دارند (Galston and Sawahnery , 1995). پلی آمینهای اصلی گیاهان عبارتند از اسپرمیدین[1] ، اسپرمین[2] و پوترسین[3] ؛ این مواد در داخل سلول با قدرت زیادی به فسفولیپیدها و نوکلئوتیدهایی چون DNA , tRNA , mRNA اتصال پیدا کرده و باعث حفظ آنها در برابر تجزیه حرارتی می گردند ، همچنین وجود آنها در حد اپتیمم[4] ، تکثیر DNA ریزنمونه را در محیط کشت درون شیشه ای افزایش می دهد (Bagni *et al* ., 1982).

در تحقیقی که بر روی قطعات ریز نمونه فلسی *L. longiflorum* در محیط حاوی اکسین و سایتوکینین انجام شد ، بخش های مختلف ریز نمونه به طرز معنی داری با افزودن پلی آمین های مختلف شروع به تشکیل پیازچه های جدید کردند. مهمترین پلی آمین مؤثر، اسپرمین به میزان ۱۰۰μmol بود که در آن تیمار، میزان اسپرمین داخلی در پیازچه ها نیز افزایش پیدا کرد. به نظر می رسد اسپرمین محرک عمده ای در تشکیل پیازچه از قطعات فلس لیلیوم باشد (Tanimoto and Matsubara ,1993a) . تنظیمات بیوشیمیایی برسنتز پروتئین و اندام زایی گیاهان تأثیر می گذارند. در تحقیقی به منظور بررسی این عوامل، ریز نمونه های برگی و فلسی لیلیوم عید پاک در محیط پایه MS حاوی یک میکرو مول NAA و BA کشت گردید. برای درک تغییرات پروتئینی در طی تمایزیابی پیازچه ها از باز دارنده های سنتز پروتئین و RNA چون اکتینومایسین D (Act-D) و یا سیکلوهگزامید (CHI) استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که Act-D , CHI به شدت از تمایز یابی پیازچه ها جلوگیری می کنند. تا روز دهم میزان پروتئین افزایش و سپس به تدریج کاهش یافت. این امر موجب ظهور پلی پپتیدهای با وزن مولکولی ۱۷KD در ریز نمونه های فلسی، برگی، و پینه

[1] Spermidine
[2] Spermine
[3] Putresine
[4] Optimum



گردید. این مسئله بیانگر آن است که به منظور تمایزیابی اندام های نابجا در لیلیوم وجود پلی پپتیدهای با وزن مولکولی کم لازم است (Ishioka and Tanimoto , 1993b).

۲,۹,۲,۸. رکود و برطرف کردن آن

رکود در جوانه ها ، بذرها و پیازها واقع می شود وتوسعه رکود در این اندام ها به منظور اجتناب از شرایط نامناسب رشدی و هماهنگ با تغییر فصل است. در ازدیاد محصولات پیازی کنترل رکود امری مهم تلقی می گردد. طی مرحله تکثیر، رکود اغلب امری نامساعد است و باعث کاهش سرعت تکثیر می گردد(Hussey,1977). در چرخه نهایی تکثیر قبل از انتقال به خاک پیازچه ها، رکود امری مطلوب است و بهتر است شاخساره تولید نگردد زیرا در حین جابجایی آسیب دیده و از رشد بعدی آن جلوگیری می شود (Gerrits *et al* ., 1992a). پیازچه های تولیدی در کشت بافت باید راکد باشند تا از جوانه زنی پیش رس درون شیشه ای ، جلوگیری شود. از طرفی این رکورد نباید خیلی عمیق باشد زیرا تیمار سرمایی طولانی ممکن است سبب آسیب رساندن به بافت و افزایش طول چرخه رشد گردد . (Gerrits *et al* ., 1992a). در مطالعات پیشین گزارش گردید که درجه حرارت بالا ، غلظت بالای ساکارز و کشت طولانی مدت سبب افزایش میزان رکود می گردد (Aquettez *et al* ., 1990).

رکود می تواند توسط دوره های کوتاه یا بلند نوری تحریک شده و حتی از بین برود (Roh and wilkins, 1977). در بررسی که بر روی گونه *L. lancifolium* انجام گرفت جوانه زنی توسط تیمار سرمایی ۴°C به مدت ۶۰ تا ۳۰ روز تحریک گردید. همچنین جوانه زنی پیازچه های حاصل توسط تیمار GA ۲۰۰ ppm یا ۱۰۰ تحریک گردید. آبسازیک اسید در غلظت های ۱۰۰-۲۰۰ ppm سبب به تأخیر افتادن جوانه زنی و خنثی شدن اثر تیمار سرمایی گردید (, Roh



1978). در مطالعه ای که بـه منظـور شکـستن رکـود در پیازچـه هـای بـاززایی شـده لیلیـوم رقـم *L. speciosum* "Rubrum" انجام گردید اثرات ABA و فلوریدون[1] که یک بازدارنده سنتز ABA است مورد بررسی قرار گرفت. در محیط کشت حاوی ABA فقط فلس تولید گردیـد و بـرگ تولیـد نشد ولی در محیط حاوی فلوریدون برگ تولید شد و از سنتز ABA نیز جلوگیری گردید ولی اثـری بر تعداد پیازچه نداشت (Kim *et al* ., 1994).

در بررسی که بر روی یک رقم لیلیوم بومی ژاپن بـه نـام *L. japonicum* "Sasa-Yuri" انجام گرفت نتایج نشان داد که تیمار سرمایی پیازچه پس از کشت بافت به میزان حداقل ۱۲ هفتـه قبـل از انتقال به خاک برای از بین بردن رکود پیازچه ها ضروری می باشد و باعث تسریع در رشد انـدام هـا می گردد که این نتایج با آزمایشات قبلی که بر روی گونه های *L. rubellum* و *L. speciosum* که توسـط نیـامی[2] انجـام گرفتـه بـود قابـل مقایـسه اسـت. (De Klerk *et al* ., 1992). در تحقیـق دیگری قطعات فلس بر روی محیط کشت MS و در دمـای ۲۵ °C و ۲۰°C در زیـر نـور یـا تـاریکی نگهداری شدند. همچنین تیمار $GA_{4,7}$ از ۰/۱mg/l تا ۱۰ mg/l به مـدت ۳ تـا ۱۲ هفتـه بـر روی پیازچه های باززایی شده ۳ ماه پس از کشت انجام گرفت. نـور یـا تـاریکی نتوانـست بـر میـزان رکـود تأثیری بگذارد. پیازچه هایی که دردمای ۲۰ °C نگهداری شده بودند کمتر به رکود رفتند. بدون تیمار سرمایی ۱۵ تا ۲۰٪ پیازچه ها سبز شدند اما رشد نکردند. ۶ هفته پس از تیمار سـرمایی پیازچـه هـا سـبز شدند ولی پیازچه هایی که ۹ تا ۱۲ هفته تیمار دیده بودند سریعتر جوانه زدند . پس از تیمار با جیبـرلین به میزان ۳ mg/l یا ۱۰ mg/l در حدود ۸۰٪ پیازچه ها جوانه زدند ولی رشد چندانی در آنها صورت نگرفت. برگهای تشکیل شده نیز کوچکتر بودند و سریعتر از پیازچه هایی که تیمار سرمایی دیده بودند از بین رفتند. در حین تیمار سرمایی با جیبرلین، وزن خـشک پیازچـه هـا کـاهش یافـت. در طـی تیمـار

[1] Fluridon
[2] Niimi



سرمایی نشاسته و گلوکومانان کاهش یافتند و قندهای محلول چون ساکارز ، گلوکز، فروکتوز و مانوز افزایش یافتند. این نسبت در پیازچه هایی که با جیبرلین تیمار شده بودند کمتر بود و فقط ۷۰٪ نشاسته به قندهای محلول تجزیه شده بود (Gerrits *et al* ., 1997b).



فصل سوم

مواد و روش ها

۳,۱. مواد گیاهی

۳,۱,۱. تهیه

مواد گیاهی مورد استفاده در آزمایشات ، فلس های پیاز چهار گونه متفاوت از انواع لیلیوم بود (عکس۱-۳) که به ترتیب زیر کشت شدند:

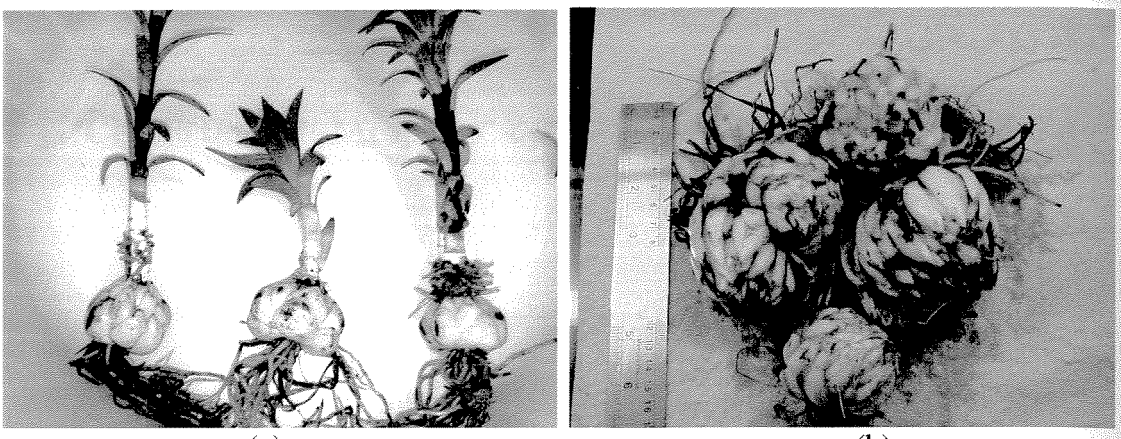
1. *Oriental Hybrid Lily* "Acapulco"
2. *Longiflorum-Asiatic (L.A.) Hybrid Lily* "Cebeco Dazzle"
3. *Asiatic Lily* " Tresor"
4. *L. ledebourii* (Baker) Boiss (**سوسن چلچراغ**)

از سه گونه اول، تعداد ۳ گلدان که هر کدام محتوی ۲ پیاز بزرگ و مناسب بودند در تاریخ ۸۵/۱۲/۰۴ از گلخانه ای واقع در میدان معلم کرج خریداری شدند. این پیازها یا هنوز جوانه نزده بودند یا بعضی ساقه کوچکی ایجاد نموده بودند.

برای دسترسی به گونه در حال انقراض و کاملاً حفاظت شده سوسن چلچراغ که به تفصیل در قسمت قبل درباره آن توضیح داده شد مجوز تهیه نمونه های گیاهی به سختی و پس از شش ماه تلاش از سازمان محیط زیست کل کشور اخذ و بالاخره در تاریخ ۸۶/۰۲/۲۸ با همراهی یکی از محیط بانان سازمان محیط زیست شهرستان رودبار به ارتفاعات داماش رفته و نهایتاً فقط تعداد ۵ پایه گیاهی از داخل حیاط یکی از روستاییان به دست آمد.

شایان ذکر است که تمام آزمایشات و روش هایی که در ادامه شرح آنها ذکر خواهد شد در بخش کشت بافت گیاهی آزمایشگاه دپارتمان بیولوژی انجام شده است.





(a) (b)

عکس ۱-۳ : (a) از راست به چپ پیاز "Tresor" *Asiatic Lily*، "Acapulco"، "Cebeco Dazzle" *LA Hybrid Lily*. (b) پیاز *L. ledebourii* (Baker) Boiss

(سوسن چلچراغ)

۳,۱,۲. نحوه ذخیره کردن[1]

پس از انتقال به آزمایشگاه همه پیازها را از خاک در آورده ریشه و ساقه های جوان آنها کاملاً چیده شده و حذف می شدند. سپس پیازها داخل بشرهای ۲ لیتری زیر آب روان به مدت ۲ ساعت قرار می گرفتند. بر روی دهانه بشر یک توری پارچه ای گذاشته می شد و هر نیم ساعت چند قطره مایع ظرف شویی به آب داخل بشر اضافه می شد. آنگاه پیازها به مدت ۳۰ دقیقه داخل محلول قارکش بنومیل[2] ۰/۳ ٪ قرار داده می شدند و در نهایت درون پارچه ای که آغشته به همان قارچکش بود پیچیده شده و درون کیسه های نایلونی مشکی قرار می گرفتند و به یخچال منتقل شده و در دمای 1°C تا موقع استفاده ذخیره می گردیدند.

[1] Storage
[2] Benomyl

۳,۲. روش های ضد عفونی[1]

۳,۲,۱. ضد عفونی سطح ریز نمونه های سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor"

در واقع به جهت دست یابی به یک روش ضد عفونی مناسب، ابتدا به تحقیقات و پژوهش های مشابه انجام شده در این زمینه مراجعه شد(van Aartrijk & Blom-Barnhoorn, 1981; Aguettaz *et al,* 1990; Bach *et al*, 2000) و سپس مواد مورد نیاز برای ضد عفونی انتخاب گردیده و برای به دست آوردن محدوده مناسب غلظت و زمان آنها، تغییراتی به ترتیبی که در جدول ۱-۳ آمده است انجام شد. به طور کلی مراحل ضد عفونی به صورت زیر انجام می گرفت:

۱. فلس های آسیب دیده و یا دارای آلودگی جدا شده و حذف می شدند.

۲. فلس های سالم از صفحه تحتانی پیاز جدا شده و در داخل یک بشر ml ۲۵۰ که بر دهانه آن یک توری پارچه ای بسته شده بود به مدت نیم ساعت زیر آب روان قرار می گرفتند.



عکس ۲-۳ : دستگاه هود لامینار (میکروبیولوژی) که با داشتن لامپ UV و دمیدن هوای استریل به داخل محفظه، یک محیط کاملاً استریل برای انجام کار کشت بافت فراهم می کند.

[1] Sterilization methods



هر ۱۵ دقیقه چند قطره مایع ظرف شویی به آب اضافه می شد. بقیه مراحل داخل دستگاه هود لامینار[1] و در شرایط کاملاً استریل انجام می شد (عکس۲-۳).

۳. فلس ها داخل محلول قارچکش بنومیل قرار می گرفتند و سپس با آب مقطر استریل شستشو داده می شدند.

۴. فلس ها داخل اتانول ۷۰ ٪ قرار می گرفتند، سپس با آب مقطر استریل شستشو داده می شدند.

۵. فلس ها داخل محلول هیپوکلریت سدیم(Sodium hypochloride (NaClO)) که دو قطره مایع ظرف شویی به منظور افزایش تماس سطحی ریز نمونه ها به آن اضافه شده بود قرار گرفته، سپس در سه ظرف استریل جداگانه با آب مقطر استریل شستشو داده می شدند، آنگاه عملیات تهیه ریز نمونه آغاز می گردید.

- برای تهیه ۵۰۰ ml محلول بنومیل ۰/۳ ٪، ۱/۵ g از قارچکش مذکور به این مقدار آب اضافه می شد.
- برای تهیه اتانول ۷۰ ٪، به میزان ۷۰ ml اتانول ۹۶ ٪ تا حجم ۹۶ ml، آب مقطر اضافه می گردید.
- برای تهیه ۵۰۰ ml محلول هیپوکلریت سدیم ۱ ٪ از یک مایع سفید کننده تجاری که حاوی ۵ ٪ ماده مؤثر هیپوکلریت سدیم بود استفاده می گردید. بدین صورت که ۱۰۰ml از محلول مذکور، با آب مقطر به حجم ۵۰۰ ml رسانده می شد.

[1] Lamina air flow Hood



جدول ۱-۳: جزئیات سه روش ضدعفونی پیاده شده بر روی سه گونه لیلیوم مورد آزمایش

گونه لیلیوم	زمان (min) و غلظت(v/w) بنومیل	زمان و تعداد آبکشی	زمان و غلظت اتانول	زمان و تعداد آبکشی	زمان و غلظت (v/v) محلول هیپوکلریت سدیم	زمان و تعداد آبکشی
Oriental Hybrid "Acapulco"	(30) – (0.15 %)	(1) – (1)	(3) – (70 %)	(1) – (1)	(15) – (1 %)	(3, 4 ,5) – (3)
L.A Hybrid "Cebeco Dazzle"	(30) – (0.3 %)	(3 , 3) – (2)	(3) – (70 %)	(3 , 3) – (2)	(15) – (1 %)	(3, 4 ,5) – (3)
Asiatic Lily "Tresor"	(30) – (0.3 %)	(3 , 3) – (2)	(3) – (70 %)	(3 , 3) – (2)	(30) – (1 %)	(3, 4 ,5) – (3)

۲ , ۲ , ۳ . ضدعفونی سطحی ریزنمونه های سوسن چلچراغ

برای ضدعفونی سطحی ریزنمونه های سوسن چلچراغ، از روشی کاملاً مشابه آنچه که برای *Asiatic Lily* "Tresor" به کار برده شد استفاده گردید زیرا همانطور که نتایج نشان داد (رجوع کنید به بخش مشاهدات و نتایج) در مقایسه کمترین میزان آلودگی در این روش حاصل شد؛ فقط از آنجا که در تحقیقی (Ghazvini *et al*, 2005) بر روی تکثیر *L. ledebourii* (Baker) Boiss، از غلظت ۲/۵ ٪ هیپوکلریت سدیم و در تحقیقی دیگر (Khosh-Khui & Azadi, 2007) از غلظت ۲ ٪ آن و در هر دو به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شده بود، در این آزمایش نیز فلس های کامل میانی پیاز به مدت ۳۰ دقیقه در



محلول ۲ ٪ هیپو کلریت سدیم قرار می گرفتند. به علاوه قارچکش مورد استفاده در روش ضد عفونی قبلی قارچ کش بنومیل بود. این قارچ کش به صورت پودر می باشد و چون نوع مرغوب آن در بازار موجود نمی باشد، نوع مورد استفاده به خوبی در آب حل نمی شود در نتیجه میزان ضدعفونی کنندگی آن پایین می باشد؛ به همین دلیل در مراحل ضدعفونی کردن پیازهای سوسن چلچراغ از یک قارچ کش مایع و مرغوب به نام دینوکاپ در غلظت ۰/۳ ٪ و به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد.

۳,۲,۳. ضد عفونی وسایل آزمایشگاهی

تمام وسایل و ادوات قابل اتوکلاو نمودن همچون ادوات شیشه ای از قبیل لوله های آزمایش، شیشه ها و فلاسک های کشت، بشر، ارلن، پی پت، پتری دیش، بالن و وسایل دیگری مثل پنس ها و اسکالپل ها، پنبه و ماسک و همچنین آب مقطر و غیره پس از شستشوی کامل توسط مایع ظرف شویی بوسیله اتوکلاو در دمای $125\ ^{\circ}C$ و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل می گردیدند.

در هنگام کشت دادن ریزنمونه ها، پنس ها و اسکالپل ها درون اتانول ۷۰ ٪ قرار داده شده و سپس بر روی شعله گرفته می شدند و پس از سرد شدن مورد استفاده قرار می گرفتند و این کار پس از کشت هر چند لوله تکرار می شد. دستگاه هود لامینار ۳۰ دقیقه قبل از شروع کار روشن گردیده و سطوح داخلی آن کاملاً با پنبه آغشته به اتانول ۷۰ ٪ ضد عفونی می گردید. هر وسیله مورد استفاده نیز قبل از آنکه زیر هود برده شود با اتانول ۷۰ ٪ ضد عفونی می شد.



۳,۳. تهیه محیط کشت

محیط کشت پایه مورد استفاده در کلیه آزمایشات، محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) بود که غلظت مواد آلی و غیر آلی آن در صفحات بعد آورده شده است. برای تهیه یک لیتر محیط، ابتدا ۶۰۰ ml آب مقطر داخل یک ارلن دو لیتری ریخته و بر روی یک دستگاه همزن-گرم کن[1] قرار داده می شد. سپس حجم مشخصی (Take) از هر محلول ذخیره را با استفاده از پیپت برداشته و به ظرف تهیه محیط کشت اضافه می گردید. موادی چون میو اینوزیتول، ساکارز، و آگار نیز مستقیماً به محیط کشت اضافه می گردیدند. مقادیر مورد نیاز هورمون های رشد BA، NAA، یا IBA پس از محاسبه از محلول های ذخیره آنها به آرامی با استفاده از میکرو پیپت برداشته و به محیط کشت اضافه می شد. سپس حجم محلول حاصل را به ۱۰۰۰ ml رسانده و pH محیط کشت با استفاده از NaoH یا HCl یک نرمال بین ۵/۸-۵/۷ تنظیم می گردید. سپس دمای دستگاه همزن-گرم کن را بر روی ۱۲۰ °C تنظیم کرده و اجازه داده می شد تا یک لیتر محیط در حین هم خوردن حرارت نیز ببیند. پس از حدود ۲۰ دقیقه، آگار کاملاً حل شده و محیط شفافی به رنگ زرد روشن حاصل می شد. آنگاه این محیط، درون لوله های آزمایشی به ابعاد ۲۵×۱۵۰ mm و به میزان حدود ۱۰ ml در هر لوله توزیع می شد. لوله های آزمایش پس از بستن درب آنها با کاغذ آلومینیومی، به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۵ °C و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل می گردیدند و پس از خروج از اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستگاه شیکر[2] قرار گرفته تا آگار آنها به خوبی پخش شود و خنک شوند. سپس لوله ها را به یخچال انتقال داده و در دمای ۱ °C تا موقع استفاده (که حداکثر سه هفته بعد می بود) نگهداری می شدند.

[1] Mixer-heater
[2] Shaker



جدول۲-۳ : غلظت و اجزای تشکیل دهنده محیط کشت اصلی MS و محلول های ذخیره

اجزای تشکیل دهنده محیط	غلظت اصلی در محیط کشت	غلظت در محلول ذخیره
عناصر پر مصرف Take = 100 ml	1X (mg/L)	10X (mg/L)
NH_4NO_3	1650	16500
KNO_3	1900	19000
$CaCl_2.2H_2O$	440	4400
$MgSO_4.7H_2O$	360	3600
KH_2PO_4	170	1700
عناصر کم مصرف Take = 25 ml	1X (mg/L)	10X (mg/L)
H_3BO_3	6.2	62
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	86
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	2.5
$MnSO_4.H_2O$	16.9	169
KI	0.83	8.3
عنصر کم مصرف آهن Take = 50 ml	1X (mg/L)	10X (mg/L)
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	278
Na-EDTA	37.2	372



ادامه جدول۲-۳ : غلظت و اجزای تشکیل دهنده محیط کشت اصلی MS و محلول های ذخیره

اجزای تشکیل دهنده محیط	غلظت اصلی در محیط کشت	غلظت در محلول ذخیره
عناصر کم مصرف مس و کبالت Take = 1 ml	**1X (mg/L)**	**100X (mg/L)**
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5
ویتامین ها Take = 25 ml	**1X (mg/L)**	**10X (mg/L)**
Nicotinic Acid	0.5	5
Pyridoxine-HCl	0.5	5
Thiamine-HCl	0.1	1
Glycine	2	20
Myo-inositol	100	موادی که مستقیماً به محیط کشت اضافه می گردید
Agar-agar	6000	
Sucrose	30000	
pH = 5.7-5.8		

۳,۳,۱. تهیه محلول های ذخیره[1]

به منظور تهیه محیط کشت، ابتدا محلول های مادری با غلظت های چند برابر به شرح زیر تهیه شده و تمامی آنها در یخچال و در دمای 1°C نگهداری می گردیدند. تمامی

[1] Stock solution preparation



مـواد شـیمیایی و ویتـامین هـا و هورمـون هـای رشـد مـورد اسـتفاده در ایـن آزمایـشات، سـاخت شرکت Merck آلمان بودند.

۳،۳،۱،۱. محلول ذخیره عناصر پر مصرف[1]

عناصر پر نیاز محیط MS همانطور که در جـدول شـماره ۱-۳ نـشان داده شـده اسـت، در ۱۰ برابر غلظت نهایی محیط کشت ابتدا توزین و سپس در آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه[2] حل مـی شـدند و حجم محلول حاصل به یک لیتر رسانده می شد. مقدار حجمی که از این محلول پایه برای تهیه یـک لیتر محیط کشت برداشت می گردید، برابر با ۱۰۰ ml بود (Take = 100 ml).

۳،۳،۱،۲. محلول ذخیره عناصر کم مصرف[3]

عناصر کم نیاز محیط MS به جز آهن و محلول های کلرید کبالت و سولفات مس، به میـزان ۱۰ برابر غلظت اصلی توزین و در آب مقطر حـل مـی گردیدنـد و حجـم محلـول حاصـل بـه ۲۵۰ ml رسانده می شد. مقدار حجم مورد استفاده از این محلول برای تهیه یک لیتر محیط کـشت برابـر بـا ۲۵ ml بود.

۳،۳،۱،۳. محلول ذخیره آهن

بـه منظـور جلـوگیری از رسـوب عنـصر آهـن، ابتـدا هـر کـدام از ترکیبـات Na_2EDTA و $FeSO_4,H_2O$ را به میزان ۱۰ برابر غلظت اصلی توزین کرده و هر کدام را در ۲۰۰ ml آب مقطر بـه صورت جداگانه حل کرده و پس از حل شدن، محلول هـا، بـا یکـدیگر مخلـوط مـی شـدند و حجـم

[1] Macronutrient
[2] Deionized
[3] Micronutrient



محلول حاصل به ml ۵۰۰ رسانده می شد. از آنجایی که این محلول باید در تاریکی نگهداری شود، اطراف ظرف حاوی آن با ورقه آلومینیومی پوشانده می شد. حجم مورد استفاده از محلول ذخیره آهن برای تهیه هر لیتر محیط کشت برابر با ml ۵۰ بود.

۳،۳،۱،۴. محلول ذخیره عناصر کم مصرف مس و کبالت

چون این عناصر باید به میزان بسیارکم استفاده گردند، لذا محلول ذخیره مورد استفاده آنها به صورت جداگانه و به میزان ۱۰۰ برابر غلظت اصلی مورد استفاده، تهیه می گردید. بدین منظور این ترکیبات، ابتدا در ۱۰۰۰ برابر غلظت اصلی توزین و سپس در ml ۱۰۰ آب مقطر حل می گردیدند. سپس ml ۱ از محلول حاصل با استفاده از پیپت به ml ۱۰۰ آب مقطر اضافه می گردید. حجم مورد استفاده از محلول ذخیره فوق به میزان ml ۱ یا µl ۱۰۰۰ بود.

۳،۳،۱،۵. محلول ذخیره ویتامین ها

به جز میو اینوزیتول که مقادیر نسبتاً بالایی از آن برای هر تهیه هر لیتر محیط کشت نیاز بود و مستقیماً به محیط کشت افزوده می گردید، سایر ویتامین ها پس از توزین به میزان ۱۰ برابر غلظت اصلی در آب مقطر حل گردیده و سپس محلول حاصل به حجم ml ۲۵۰ رسانده می شد. حجم مورد استفاده برای تهیه هر لیتر محیط کشت ml ۲۵ بود.



۳،۳،۱،۶. محلول ذخیره هورمون های رشد

محلول های ذخیره همه هورمون های رشد مورد استفاده در آزمایشات انجام شده در غلظت ۲ mg در ۱۰ ml آب مقطر تهیه می شدند. از آنجائیکه هورمون های رشد مستقیماً در آب حل نمی شوند، ابتدا ۲ mg از هورمون مورد نیاز در چند قطره سود یک نرمال کاملاً حل شده و سپس حجم هورمون حل شده با استفاده از آب مقطر به ۱۰ ml رسانده می شد. آنگاه بر اساس غلظت مورد نیاز هورمون، حجم مشخصی از آن پس از محاسبه، از محلول ذخیره برداشت گردیده و به محیط کشت اضافه می گردید.

به عنوان مثال هنگامیکه نیاز بود غلظت IBA mg/l ۰/۰۱ به محیط کشت اضافه شود، با استفاده از میکروپیپت µl ۵۰ از محلول ذخیره برداشته و به محیط کشت افزوده می گردید.

۳،۳،۲. محیط کشت جوانه زایی[1]

مراحل تهیه محیط کشت قبلاً به تفصیل ذکر گردید. در محیط کشتی که برای تولید جوانه در این چهار گونه متفاوت لیلیوم به کار گرفته شد از هورمون های رشد شامل اکسین NAA و سایتوکینین BA استفاده گردید به این صورت که :

- اولین گروه ریزنمونه ها در تاریخ ۸۵/۱۲/۲۵ به تعداد ۱۰۰ لوله از پیاز لیلیوم گونه *Oriental Hybrid Lily* "Acapulco" بر روی محیط پایه MS که حاوی ۰/۱ mg/l NAA + ۰/۱ mg/l BA بود کشت شد.

[1] Shooting medium



- دومین گروه ریزنمونه ها در تاریخ ۸۶/۰۱/۲۴ به تعداد ۱۰۰ لوله از پیاز لیلیوم گونه *L.A. Hybrid Lily* "Cebeco Dazzle" بر روی محیط پایه MS که حاوی ۰/۱ mg/l NAA + ۰/۱ mg/l BA بودکشت شد. چهار هفته بعد تمام ریزنمونه های باقی مانده بر روی محیط تازه MS که حاوی ۰/۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l BA بود کشت شدند. از آن به بعد ریز نمونه ها و پیازچه های حاصل از آنها پس از هر چهار هفته به محیط کشت جدیدی با همین غلظت، کشت مجدد[1] شدند.

- سومین گروه ریزنمونه ها در تاریخ ۸۶/۰۲/۲۰ به تعداد ۱۰۰ لوله از پیاز لیلیوم گونه *Asiatic Lily* "Tresor" بر روی محیط پایه MS که هورمونی به آن اضافه نشده بود،کشت شدند. در مورد این سه گروه ذکر شده نتایج حاصل از هشت هفته بررسی در فصل بعدی آورده شده است.

- در مورد گونه چهارم یعنی *L. ledebourii* (Baker) Boiss پنج گروه (غلظت) لوله کشت شدند. هر هفته لوله ها برای کنترل آلودگی بررسی می شدند و هر ۴ هفته نیز واکشت ریزنمونه ها انجام می شد و پس از ۱۰ هفته فاکتورهای رشد مورد نظر رکورد شدند.

[1] Reculturing



جدول ۳-۳ : پنج گروه کشت شده از ریزنمونه های سوسن چلچراغ

زمان رکورد اطلاعات	زمان کشت	تعداد لوله	غلظت هورمون	محیط کشت پایه
۱۰ هفته بعد از زمان کشت	۸۶/۰۴/۰۱	۱۲	Control	MS
	۸۶/۰۴/۰۸		۰/۱ BA	
	۸۶/۰۴/۱۵		۱ BA	
	۸۶/۰۴/۲۲		۰/۱ NAA	
	۸۶/۰۴/۲۹		۱ NAA	

۳,۳,۳. محیط کشت کالوس زایی[1]

از آنجائیکه انتقال ریزنمونه های لیلیوم گونه دوم مورد آزمایش (*L.A. Hybrid Lily* "Cebeco Dazzle") به محیط حاوی ۰/۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l BA مشخصاً باعث کالوس زایی در این ریزنمونه ها شد، از آن پس برای تولید کالوس (به جهت تولید و تکثیر پیازچه

[1] Callus inducing medium



های جدید) در این گونه، از این غلظت هورمونی استفاده می شد. در سه گونه مورد آزمایش دیگر از روش کالوس زایی برای ازدیاد پیازچه ها استفاده نشد.

۳,۳,۴. محیط کشت ریشه زایی

۳,۳,۴,۱. سه گونه "Acapulco" ، "Cebeco Dazzle" ، و "Tresor"

ابتدا محیط MS با سه غلظت هورمونی متفاوت با استفاده از هورمون های زیر تهیه شد :

1. MS + ۱ mg/l NAA + ۰/۱ mg/l BA
2. MS + ۰/۵ mg/l IBA
3. MS + ۱ mg/l IBA

آنگاه تعداد ۵۰ پیازچه رشدکرده برگدار (دارای گیاهچه هایی حداقل به طول ۳ cm) از هر یک از سه گونه مذکور در ۵۰ لوله جداگانه (جمعاً ۱۵۰ لوله کشت)، ابتدا به مدت چهار هفته در غلظت اول کشت شدند سپس در پایان هفته چهارم از محیط خارج شده و ۱۰ گیاهچه ریشه دار از هر گونه به طور تصادفی انتخاب شده و طول بلندترین ریشه آنها اندازه گیری شد؛ آنگاه تعداد ۲۵ عدد از کل گیاهچه های هر گونه به غلظت دوم و ۲۵ عدد دیگر به غلظت سوم منتقل شدند و به مدت چهار هفته دیگر به رشد خود در این محیط ها ادامه دادند و دوباره در پایان هفته هشتم از محیط خارج شده و ۱۰ گیاهچه ریشه دار از هر گونه به طور تصادفی انتخاب شده و طول بلندترین ریشه آنها اندازه گیری شد؛ آنگاه گیاهچه های ریشه دار شده به خاک (درون گلدان) انتقال داده شده و در اتاق سازگاری[1] (رجوع شود به قسمت قرارگرفتند.

[1] Acclimatization room



۳,۳,۴,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss

در مورد این گونه، ابتدا محیط MS با استفاده از همان دو اکسین ریشه زای مورد استفاده در آزمایش قبل (NAA و IBA) در سه غلظت زیر تهیه شد سپس همه پیازچه های به دست آمده از محیط های جوانه زایی به طور مساوی بین این سه غلظت تقسیم شده کشت شدند.

1. MS + ۰/۵ mg/l IBA
2. MS + ۰/۱ mg/l NAA
3. MS + ۱ mg/l NAA

پس از چهار هفته تمام پیازچه ها از محیط ها خارج شده و ۱۰ پیازچه ریشه دار از هر غلظت به طور تصادفی انتخاب شده و طول بلندترین ریشه آنها اندازه گیری شد.

۳,۴. مراحل کشت بافت

۳,۴,۱. استقرار ریز نمونه ها

فلس های ضد عفونی شده اولیه، در محیط استریل هود لامینار به نوبت داخل یک پتری دیش قرار داده شده و با استفاده از پنس و اسکالپل استریل ابتدا یک سوم نیمه بالایی آنها جدا می شدند و سپس بخشهایی از انتهای نیمه پایینی آنها که در اثر قرار گرفتن در مواد ضد عفونی کننده بافتشان آسیب دیده بود، جدا شده و حذف می گردید. آنگاه از ماده گیاهی باقی مانده، ریزنمونه هایی به ابعاد ۵×۵ mm جدا می شد. برای کشت ۱۰۰ لوله آزمایش، بسته به اندازه فلس ها، بین ۱۰ تا ۱۵ فلس کامل از پیاز به کار برده می شد. فلس های به کار برده شده از بخش های میانی پیاز انتخاب می شدند. ریزنمونه های حاصل به آرامی از سمت پشتی (abaxial side) خود بر روی محیط کشت قرار داده می شدند. پس از

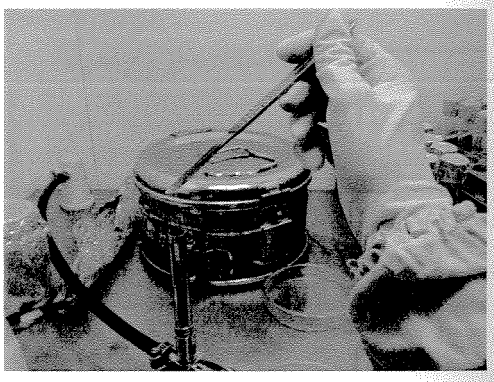


کشت کردن همه لوله ها، آنها را از داخل هود بیرون آورده و در تمام آنها با پارا فیلم[1] کاملاً محکم می شد[2] و سپس به دستگاه ژرمیناتور[3] که دارای شرایط کاملاً کنترل شده ای برای رشد می باشد منتقل می گردیدند. هر هفته تمام لوله ها کنترل و بررسی شده و ثبت اطلاعات انجام می شد و در صورت مشاهده آلودگی قارچی یا باکتریایی لوله های آلوده حذف می شدند (عکس ۳-۳).

نکته مهم اینکه ریزنمونه ها ابتدا بر روی محیط بدون هورمون رشد کشت می شدند و سپس به تدریج پس از گذشت ۱۴-۷ روز از کشت اولیه، به محیط کشت شاخه زایی و یا کالوس زایی منتقل می شدند.



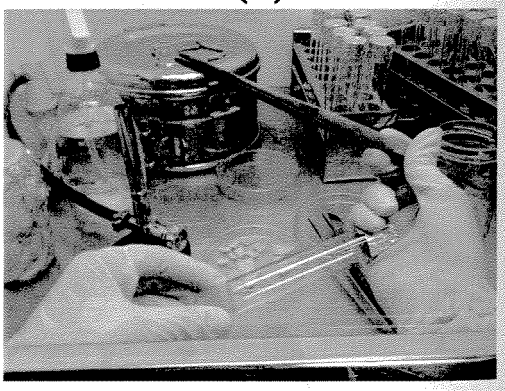
(a)



(b)



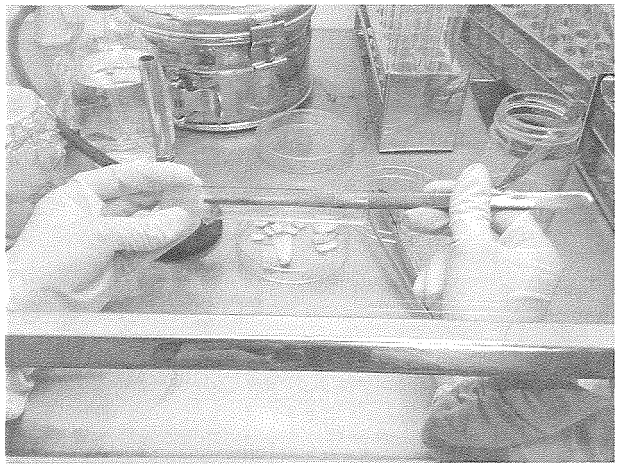
(c)



(d)

[1] Parafilm
[2] Sealed
[3] Germinator





(e)



(f)

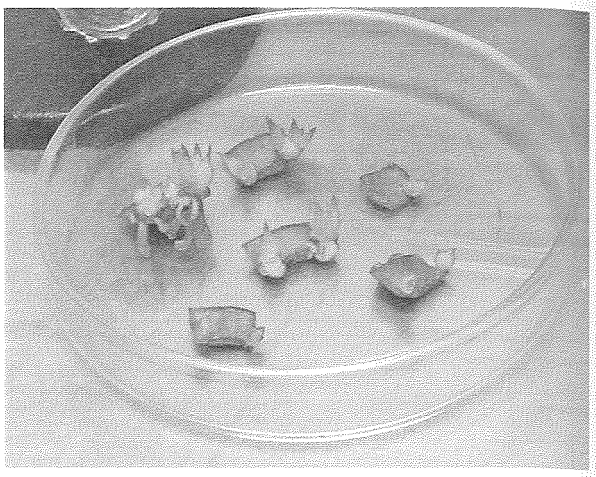
عکس ۳-۳ : مراحل استقرار ریزنمونه ها که به ترتیب از (a) تا (f) انجام می شدند

۳,۴,۲. نحوه ازدیاد[1] پیازچه ها

۳,۴,۲,۱. با استفاده از ریزنمونه

هر چهار هفته به جهت کشت مجدد بر روی همان محیط کشت تازه، لوله های کشت شده از ژرمیناتور خارج شده، با اتانول ۷۰٪ ضد عفونی می شدند و به داخل محفظه هود لامینار منتقل می شدند. ریزنمونه ها را یکی پس از دیگری از داخل لوله ها خارج نموده و در داخل پتری دیش قرار داده می شد (عکس ۴-۳). ریزنمونه هایی که بیش از یک پیازچه تولید نموده بودند در فاصله بین پیازچه ها و با استفاده از اسکالپل مجزا می شدند به طوریکه تکه هایی با یک یا دو پیازچه حاصل می شدند. آنگاه ریزنمونه های جدید به دست آمده از ریزنمونه اولیه، به محیط های کشت جدید انتقال می یافتند. در طول چهار هفته آینده، این ریزنمونه های جدید پیازچه های جدیدی تولید می کردند که دوباره به روش ذکر شده ریزنمونه های جدیدی از آنها تهیه می شد.

[1] Proliferation

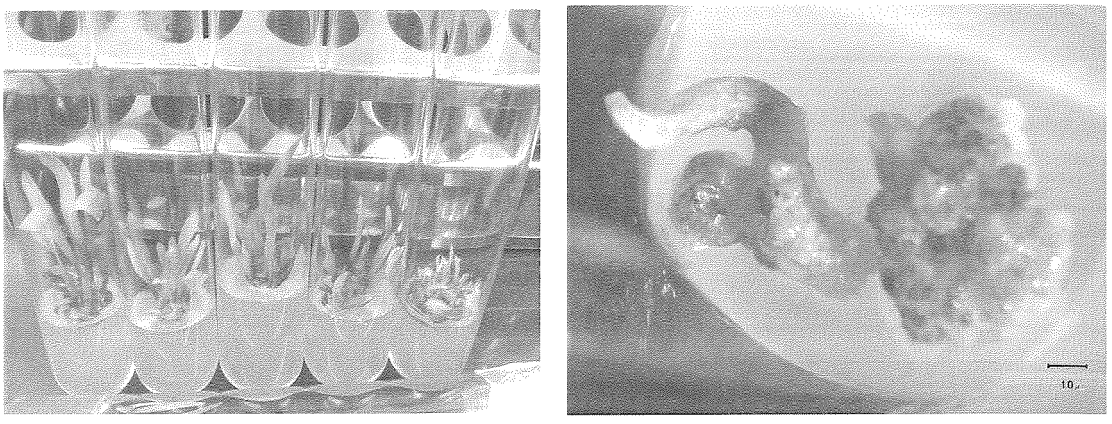


عکس۴-۳ : تعدادی ریزنمونه که پس از چهار هفته از محیط خارج شده و برای ازدیاد به روش مندرج در متن به فضای استریل انتقال داده شده اند

۳,۴,۲,۲. با استفاده از کالوس

ابتدا از فلس های ضد عفونی شده، ریزنمونه ها ی mm ۵×۵ تهیه شده و بر روی محیط کشت کالوس زایی قرار داده می شدند. هر هفته ثبت اطلاعات و کنارگذاری لوله های آلوده انجام می گردید. بافت کالوس از اوایل هفته دوم ظاهر شده و به سرعت شروع به رشد می کرد و در حدود هفته سوم جوانه هایی که پیازچه های اولیه بودند تمایز می یافتند. پس از گذشت هر چهار هفته، کالوس های حاصل از یک ریزنمونه در داخل محفظه هود لامینار از آن جدا شده و اگر بزرگ بودند به چند تکه تقسیم می شدند (عکس a ۵-۳). پیازچه های تشکیل شده بر روی این کالوس ها نیز اگر به اندازه کافی رشدکرده و گیاهچه هایی در حدود ۳ تا ۵ سانتی متر تولید نموده بودند، از روی کالوس جدا شده و به محیط ریشه زایی انتقال داده می شدند (عکس b ۵-۳). بدین ترتیب از یک ریزنمونه هر بار ۳ تا ۴ لوله جدید تهیه می گردید. خود ریزنمونه اولیه نیز دوباره به جهت تولید کالوس جدید، بر روی یک محیط کالوس زای تازه، کشت می گردید. لوله های جدید دوباره درون ژرمیناتور قرار می گرفتند.





(a)

عکس ۵-۳ : (a) نمونه ای از دو توده کالوس کشت شده که در حال تولید گیاهچه می باشند . (b) چهار گیاهچه کشت شده در سمت چپ ، همه از روی کالوس همان لوله اول سمت راست جدا شده اند و در محیط ریشه زایی کشت شده اند

۳,۴,۳. انتقال به محیط ریشه زایی

پس از آنکه پیازچه های حاصل از ریزنمونه ها و کالوس ها، رشد کرده و به گیاهچه های ۵-۳ cm تبدیل شدند، این گیاهچه ها که حالا اکثر آنها دارای ریشه های بسیار کوتاهی نیز در انتهای پیازچه های خود بودند (عکس ۶-۳)، در فضای استریل هود لامینار به آرامی و با استفاده از دو پنس استریل از روی ریزنمونه یا کالوس خود جدا شده و سپس بدون اینکه با اسکاپل قسمتی از آنها قطع شود (تجربه نشان داد که استفاده از اسکالپل برای این کار مانع از ریشه زایی در سطح برش خورده می شود)، به محیط های کشت ریشه زایی که قبلاً غلظت آنها ذکر شد بر حسب نیاز منتقل شده و به شرایط ثابت ژرمیناتور بازگردانده شدند.



عکس ۶-۳ : دو ریزنمونه که هریک دارای چندین گیاهچه مناسب برای انتقال به محیط ریشه زایی می باشند.

راست: "Tresor" ، چپ: "Ceb Dazzle"

۳،۵. شرایط داخل ژرمیناتور

ژرمیناتور در واقع یک اتاق رشد کوچک می باشد و دستگاهی است که می توان داخل آن عواملی همچون میزان رطوبت، شدت نور، درجه حرارت، و طول دوره نور و تاریکی را با دقت کنترل کرد (عکس ۷-۳).

به طور کلی شرایط تنظیم شده داخل ژرمیناتور برای تمام آزمایشات و محیط های کشت مختلف، یکسان و صورت زیر بود :

میزان رطوبت نسبی = به طور ثابت 70 ± 10 %

درجه حرارت = به طور ثابت $25 \pm 1°C$

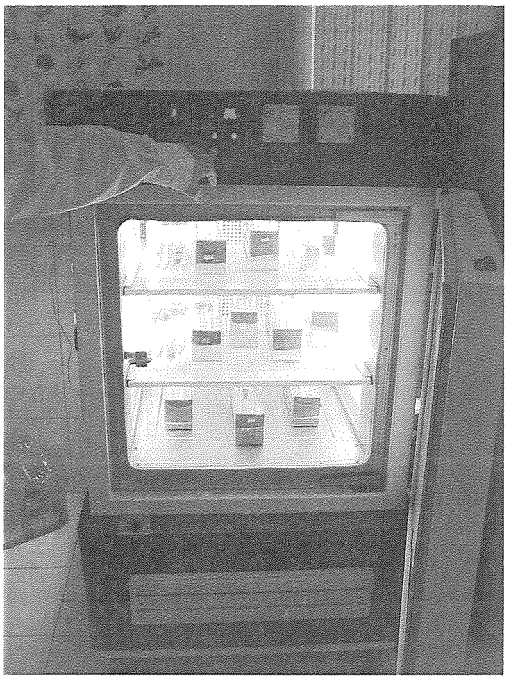
طول دوره نور و تاریکی[1] = ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی

شدت نور = ریز نمونه های اولیه کشت شده در پایین ترین طبقه دستگاه در معرض 1500-1800 lux (25-30 $\mu mol/m^2s$) و پس از جوانه زدن و تولید پیازچه های سبز

[1] Photoperiod



و برگدار و همچنین پس از انتقال به محیط ریشه زایی، به طبقات بالاتر ژرمیناتور منتقل شده و در معرض lux 2800-3000 نور قرار می گرفتند. محیط های کشت کالوس زا نیز ابتدا در طبقه پایین و سپس کالوس های تولید شده پس از انتقال به محیط کشت تولید پیازچه، به طبقات بالا برده می شدند.



عکس ۷-۳ : نمایی از دستگاه ژرمیناتور که محیط های کشت در تمام مدت داخل آن نگهداری می شدند

۳,۶. انتقال به خاک و سازگاری

۳,۶,۱. سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor"

در این مرحله،گیاهچه هایی که در محیط های کشت ریشه زایی ریشه های cm ۳-۲ تولید نموده بودند از شیشه های کشت خارج کرده و به آرامی محیط کشت باقی مانده بر روی ریشه ها در زیر آب روان شسته می شد (عکس c ۸-۳). آنگاه ریشه ها برای چند ثانیه درون محلول قارچکش دینوکاپ[1] ۰/۳ ٪ فرو برده می شدند (عکس d ۸-۳) و سپس گیاهچه ها درون گلدان های کوچک

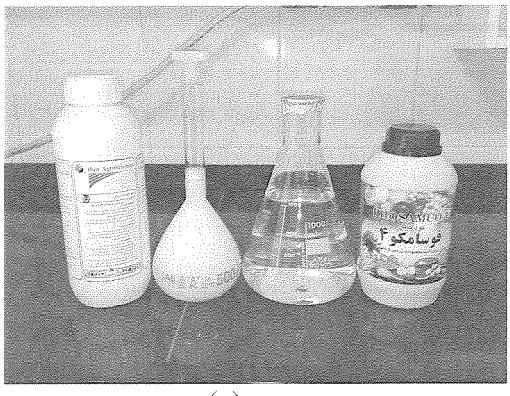
[1] Dinocap

۱۰ cm به صورتی که تمام طول ریشه و همچنین خود پیازچه درون خاک قرار می گرفت کاشته می شدند (عکس ۸-۳e). در هر گلدان ۲ یا ۳ پیازچه کاشته می شد. خاک گلدان ها شامل مخلوطی از ۵۰ ٪ کوکوپیت[1] و ۵۰ ٪ پرلیت[2] بود (عکس ۸-۳b). در هنگام مخلوط کردن خاک ها و قبل از توزیع آنها در گلدانها، میزان یک لیتر محیط MS (فقط شامل نمک های غیرآلی و بدون ساکارز، آگار، و ویتامین ها) به مخلوط خاک اضافه می شد. سپس گلدانها بر حسب طول ریشه گیاهچه، تعداد پیازچه کاشته شده درگلدان، و تاریخ کاشت، برچسب خورده، دو به دو درون کاورهای شفاف قرار داده شده و پس از بستن دهانه کاورها به اتاق سازگاری انتقال می یافتند (عکس ۸-۳f). هر روز دهانه کاورها به مدتی مشخص باز گذاشته می شد تا گیاهچه های کاشته شده هوادهی شوند و هر هفته مدت زمان این هوادهی افزایش می یافت تا به تدریج گیاهچه ها با رطوبت و هوای طبیعی سازگار شوند. تعداد ۳۰ گلدان از هر یک از سه گونه لیلیوم مورد آزمایش بدین ترتیب کاشته شد. تقریباً هر سه روز گلدانها با آبفشان آبیاری شده و با مه پاش نیز خود گیاهچه ها مرطوب نگه داشته می شدند. هر دو هفته برای آبیاری گلدانها از یک کود مایع به نام فوسامکو[3] در غلظت ۰/۲ ٪ استفاده می شد. هوادهی نیز در هفته اول بین ۲ تا ۴ ساعت انجام می شد؛ در هفته دوم بین ۴ تا ۸ ساعت، در هفته سوم بین ۸ تا ۱۶ ساعت، و در هفته چهارم دیگر دهانه کاورها بسته نمی شدند. در انتهای هفته چهارم تمام گلدان ها را از درون کاورها خارج کرده لکن هنوز چند روز دیگر در شرایط اتاق سازگاری نگهداری می شدند. متعاقباً این گلدان های سازگار شده به گلخانه که شرایطی تقریباً نزدیک به شرایط اتاق سازگاری داشت انتقال داده می شدند.

---

[1] Coco-peat
[2] Perlite
[3] Phosamco

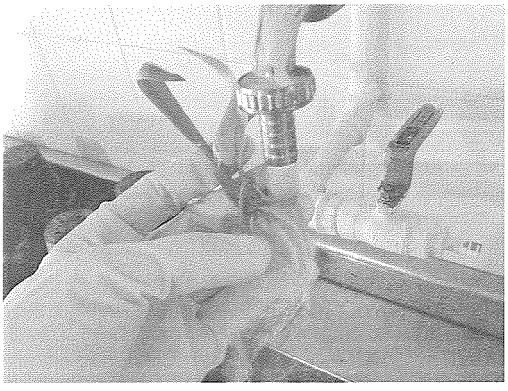




(a)



(b)



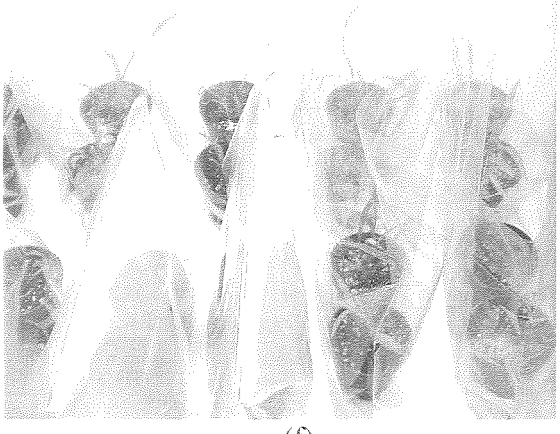
(c)



(d)



(e)



(f)

عکس ۸-۳ : مراحل انتقال به خاک که به ترتیب از a تا f انجام می شدند (a) محلول های لازم از راست به چپ : کودمایع فوسامکو، یک لیتر محیط MS، قارچکش دینوکاپ.

۳,۶,۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss

عملیات انتقال به خاک کاملاً مشابه سه گونه قبل انجام شد فقط نکته قابل ذکر اینکه پیازچه های سوسن چلچراغ در زمان انتقال به محیط ریشه زایی و حتی در زمان انتقال به خاک هیچ گیاهچه ای تولید نکردند. بدین ترتیب تعداد ۲۰ گلدان از پیازچه های حاصل از تمامی غلظت ها که هر یک دارای ریشه هایی به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی متر بودند، و در هر گلدان ۲ یا ۳ پیازچه کاشته شد و به اتاق سازگاری منتقل شدند.

۳,۶,۳. شرایط اتاق سازگاری

اتاق سازگاری اتاق بسته ای بود که فقط یک پنجره داشت که از آن نور خورشید با شدت کم و به صورت کاملاً غیر مستقیم وارد اتاق می شد. درجه حرارت اتاق در حدود $۲۳ \pm ۳^{\circ}C$ و رطوبت نسبی نیز ٪۱۰ ± ۶۰ تنظیم شد. گلدانها در زیر پنج لامپ فلوروسنت ۱۲۰ cm و در فاصله ۴۰ cm از آنها قرار گرفتند و طول دوره نور ۱۶ ساعت و دوره تاریکی ۸ ساعت تنظیم شد.



فصل چهارم

مشاهدات و نتایج

در طول مدت پروژه انجام شده که هدف اصلی آن تکثیر گل در حال انقراض سوسن چلچراغ . *Lilium Ledebourii* (Baker) Boiss و سه گونه دیگر لیلیوم از طریق کشت بافت (مقایسه روش های ضدعفونی، تأثیر هورمون های رشد BA و NAA ، و شرایط سازگاری) بود، مراحل زیر دنبال شد :

۱. ضد عفونی دقیق بافت گیاهی مورد استفاده که در تمام آزمایشات، فلس پیازهای چهار گونه لیلیوم بوده است. (در تمام این آزمایشات فقط از نیمه تحتانی فلس ها برای ریزنمونه گیری استفاده شد.)

۲. تهیه ریزنمونه از بافت ضد عفونی شده در شرایط کاملاً استریل و کشت دادن این ریزنمونه ها بر روی یک محیط مصنوعی غنی که دارای غلظت مناسبی از هورمون های محرک رشد جوانه بوده و قرار دادن این مجموعه (ریزنمونه ها و محیط ها) در یک اتاق کشت در شرایط کاملاً کنترل شده از نظر نور و حرارت و رطوبت به قصد آنکه تمام این عوامل و محرک ها پس از مدتی منجر به تحریک ریزنمونه ها برای تولید جوانه های جدید وتبدیل آن به پیازچه ها و نهایتاً گیاهچه های کوچکی شود. محیط کشت مذکور را محیط تولید جوانه می نامند.

۳. جدا کردن گیاهچه های حاصل از روی ریزنمونه و کشت دادن آنها بر روی یک محیط مصنوعی غنی جدید که حاوی غلظت مناسبی از یک هورمون محرک رشد ریشه می باشد و نگهداری گیاهچه ها در اتاق کشت در شرایط کاملاً کنترل شده نور و حرارت و رطوبت که نهایتاً پس از مدت زمان معینی ریشه هایی با ساختار



مناسب برای جذب مواد مغذی خاک حاصل شود.

۴. خارج کردن گیاهچه های ریشه دار شده از شرایط کاملاً استریل درون لوله ها وفلاسک های کشت و کاشتن آنها در درون گلدان های حاوی مخلوطی از خاک پیت و پرلیت و انتقال گلدان ها به اتاق سازگاری و نگهداری آنها در شرایط کنترل شده نور، حرارت و رطوبت (که نزدیک به شرایط واقعی آن در طبیعت می باشد) به جهت سازگار کردن گیاهچه ها با شرایط طبیعی و واقعی.

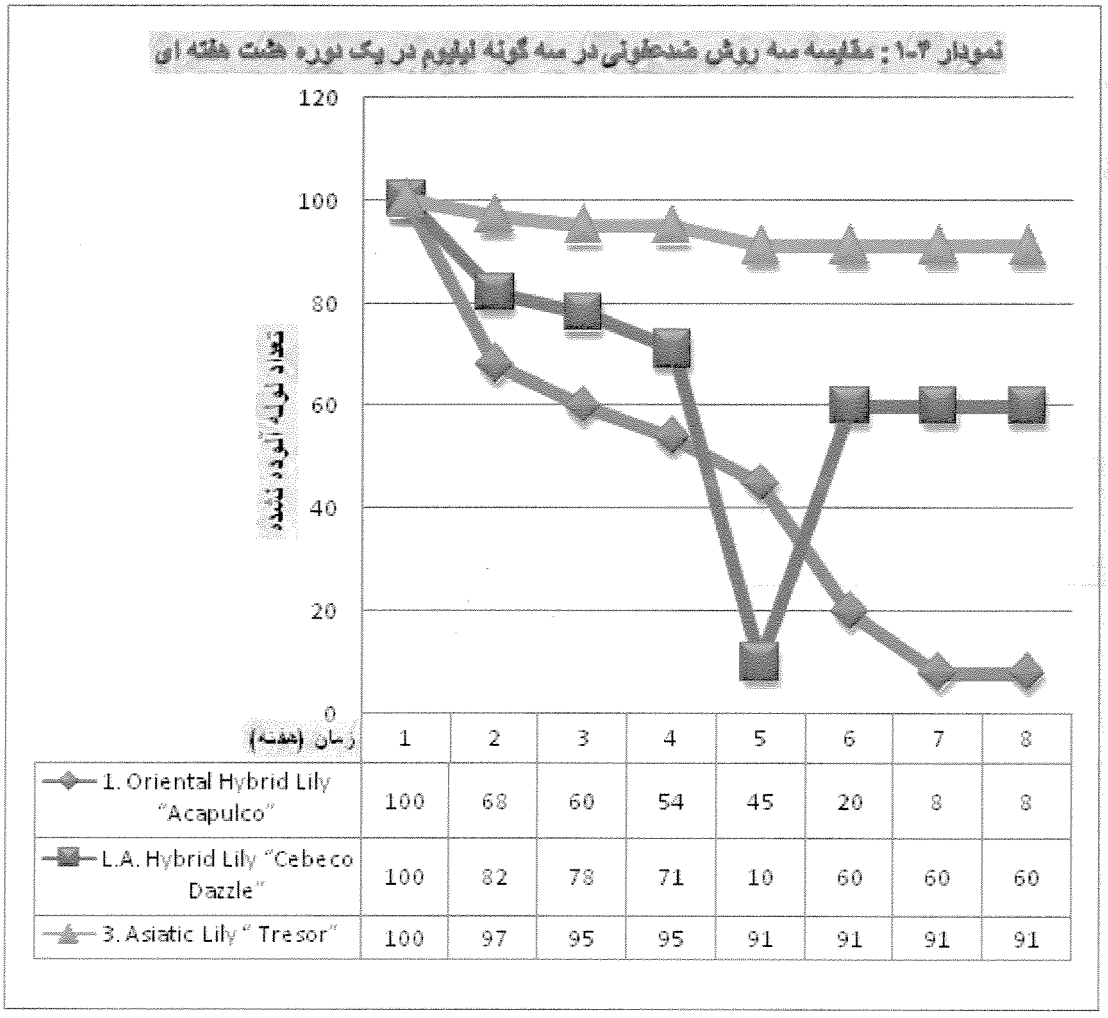
۵. انتقال گلدان ها به گلخانه و قرار دادن آنها در معرض نور خورشید و چرخه طبیعی نوری.

آنچه در ادامه می آید مشاهدات و نتایج حاصل از پیاده سازی مراحل فوق است که به ترتیب مراحل مذکور می باشد :



۴.۱. مرحله اول : ضد عفونی سطحی

۴.۱.۱. مقایسه سه گونه "Acapulco" ، "Cebeco Dazzle" ، و "Tresor"

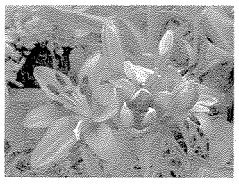


زمان (هفته)	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Oriental Hybrid Lily "Acapulco"	100	68	60	54	45	20	8	8
L.A. Hybrid Lily "Cebeco Dazzle"	100	82	78	71	10	60	60	60
3. Asiatic Lily " Tresor"	100	97	95	95	91	91	91	91

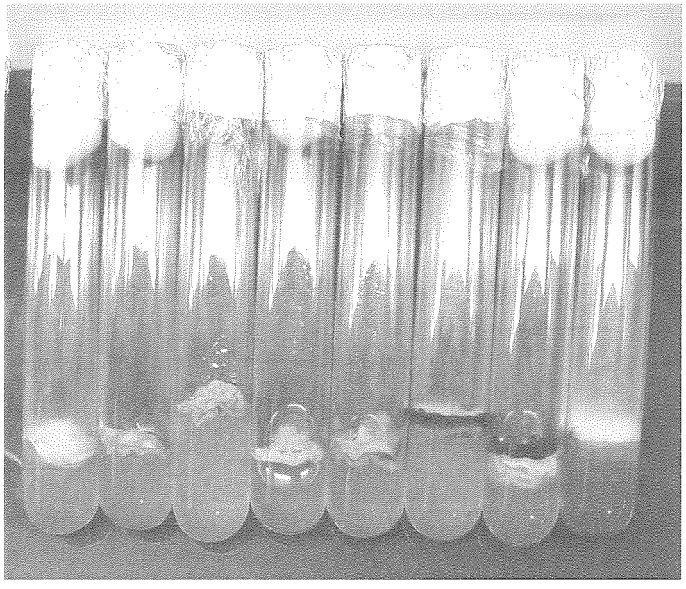
تاریخ کشت "Acapulco" : ۸۵/۱۲/۲۵ ، "Ceb Dazzle " : ۸۶/۰۱/۲۴ ، و "Tresor" : ۸۶/۰۲/۲۰ .

برای توضیح کامل در مورد شیب ناگهانی که در هفته پنجم منحنی دوم (مربع) دیده می شود به متن رجوع شود.

با مقایسه سه منحنی ترسیم شده در نمودار ۱-۴ مشاهده می شود که تعداد لوله های آلوده نشده پس از پایان هشت هفته، در کشت گروه دوم (۶۰ لوله) نسبت به کشت



گروه اول (۸ لوله) و درکشت گروه سوم (۹۱ لوله) نسبت به کشت گروه دوم تفاوت چشم گیری داشته است. این نتایج نشان می دهد که روش ضدعفونی هربار بهبود یافته و تغییراتی که هر بار اعمال می شده تاثیر مثبتی در کاهش میزان آلودگی داشته است. به علاوه عامل تجربه آزمایشگر را هم باید در نظر گرفت بدین معنی که هر بار تکرار آزمایش موجب افزایش تجربه و سرعت عمل آزمایشگر در کار شده و نتیجتاً درصد آلودگی پایین آمده است.



عکس ۱-٤: تعدادی از لوله های آلوده از هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش

در مورد شیب ناگهانی که در منحنی دوم بین هفته چهارم و ششم دیده می شود ، باید گفت که در هفته چهارم تعداد ۷۰ لوله باقی مانده از کشت گروه دوم "Cebeco (*L.A Hybrid* Dazzle") به محیط جدید انتقال یافتند. محیط جدید در فلاسک های کشت ریخته شده بود که دارای دهانه بزرگی می باشند و در نتیجه احتمال آلودگی را بیشتر می نمایند. به علاوه در آن زمان هنوز امکانات لازمه به نحو کامل فراهم نشده بود و کشت و انتقال بافت ها داخل محفظه یک هود عمومی انجام می شد. موارد بالا به همراه تجربه کم



آزمایشگر باعث شد که علی رغم رعایت کلیه جوانب وکار کردن در کنار شعله، در هنگام انتقال تعداد ۶۰ عدد از محیط های جدید آلوده شوند. اکثر آلودگی ها به صورت میسلیوم های قارچی و دور از ریزنمونه رشد کردند (عکس a ۲-۴). لازم به توضیح است که عموماً برای جلوگیری از انتشار هرگونه آلودگی در کشت های جدید گیاهی قبل از باز کردن درب کشت های آلوده، کلیه آنها بدون استثنا اتوکلاو شده و ظروف آنها کاملاً شسته می شوند. ولکن در این مورد از آنجائیکه یک هفته پس از انتقال به محیط جدید (هفته پنجم) گیاهچه ها به خوبی بر روی ریزنمونه ها رشد کرده بودند، تصمیم بر این شد که علی رغم وجود آلودگی، ریزنمونه هایی که واجد میسلیوم های قارچی بوده لکن آلودگی در فاصله دورتر از آنها رشد کرده بود حذف نشده، نجات داده شوند. به همین دلیل برای جلوگیری از آلودگی احتمالی هود عمومی موجود توسط اسپور قارچهای رشد کرده در محیط های آلوده، ابتدا فضای داخل یک محفظه کوچک مجزا توسط محلول هیپوکلریت ۱ ٪ و سپس اتانول ۷۰ ٪ کاملاً آغشته شده و تمیز گردید سپس تمامی فلاسک های کشت به همراه همان تعداد از فلاسک های استریل (فاقد محیط کشت)، تعدادی پنس و یک چراغ الکلی داخل محفظه که قبلا دهانه آن با یک نایلون ضخیم پوشانده شده بود، انتقال داده شد. آنگاه در کنار شعله و به آرامی در محیط های آلوده باز و ریزنمونه ها به همراه گیاهچه های روی آنها به فلاسک های استریل منتقل شدند. فلاسک های جدید که تعداد آنها هم ۶۰ عدد بود پس از آنکه سطحشان دوباره با اتانول ۷۰ ٪ آغشته شد، به محفظه هود عمومی انتقال یافتند و در آنجا به صورت زیر ضد عفونی شدند :

گروه اول : ۵۰ ریزنمونه و گیاهچه های روی آنها ابتدا به مدت ۴۵ ثانیه درون محلول



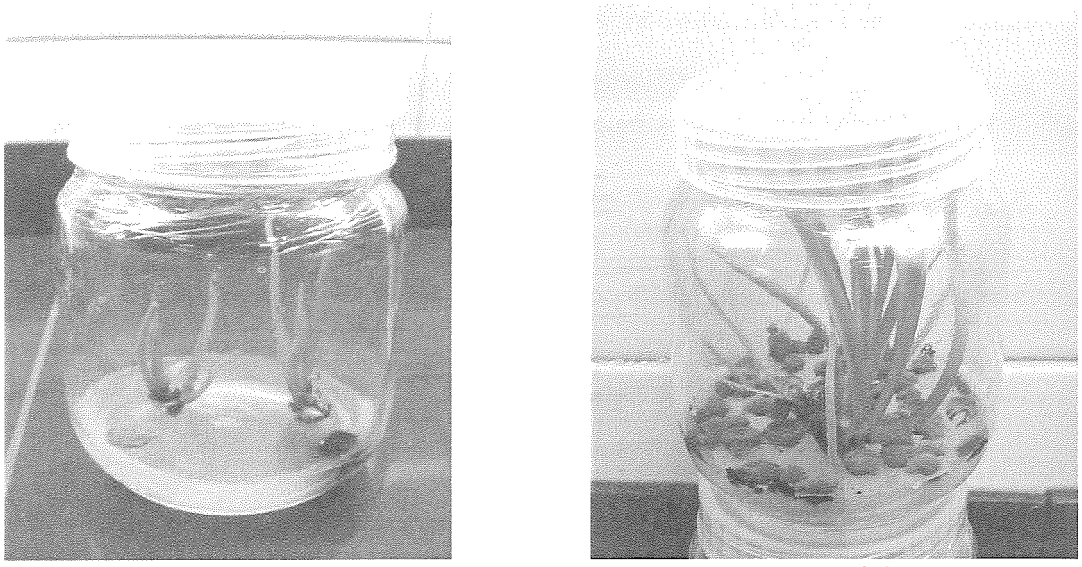
هیپوکلریت ۱ ٪ غوطه ور شدند و سپس دو بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شده و در محیط های جدید استریل با همان غلظت قبلی هورمون های رشد، کشت شدند.

گروه دوم : ۱۰ ریزنمونه به همراه گیاهچه های آنها نیز فقط دو بار (هر بار ۳ دقیقه) با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و سپس در محیط های جدید کشت شدند.

نتیجه حاصله به این صورت بود که پس از ۳ هفته هیچ کدام از محیط های گروه اول آلودگی جدیدی نشان ندادند و در واقع محلول هیپوکلریت در غلظت و زمان مذکور به خوبی آلودگی های احتمالی را ضد عفونی نمود. بر عکس در کلیه ۱۰ محیط گروه دوم همان آلودگی های قارچی قبل دوباره مشاهده شدند که نشان دهنده ناکافی بودن شستشوی تنها با آب مقطر استریل می باشد (عکس b ۲-۴).

نهایتاً ۵۰ لوله باقی مانده پس از این مرحله ضد عفونی به همراه ۱۰ لوله که در واکشت اول آلوده نشده بودند، کل ۶۰ لوله باقی مانده در این گروه را تشکیل دادند.





(a) (b)

عکس ۲-٤ : (a) آلودگی قارچی دور از گیاهچه نشان می دهد که خود گیاهچه استریل بوده و در هنگام انتقال، استریل نبودن محفظه کار باعث آلوده کردن محیط شده است. (b) نمونه ای از گروه دوم یک هفته پس از انتقال

۴.۱.۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss

ضد عفونی سطحی ریزنمونه ها باعث شد آلودگی قارچی به کلی در این گونه حذف شود ولی نکته قابل توجه اینکه که نوعی آلودگی باکتریایی تقریباً در تمام لوله های کشت شده پس از دو هفته ظاهر شد. آلودگی به شکل هاله ای کدر از اطراف ریزنمونه در سطح محیط شروع به رشد کرده و معمولاً این هاله به داخل محیط در زیر ریزنمونه به صورت چین خورده امتداد پیدا می کرد (عکس b و a ۳-۴).

از آنجائیکه در تعداد کمی از لوله های کشت شده آلودگی مذکور دیده نمی شد (حداقل با چشم غیر مسلح قابل رویت نبود)، این تصور پیش آمد که احتمالاً در روش ضدعفونی دقت کافی به عمل نیامده، ولی اولاً مراحل ضدعفونی با نهایت دقت و حوصله

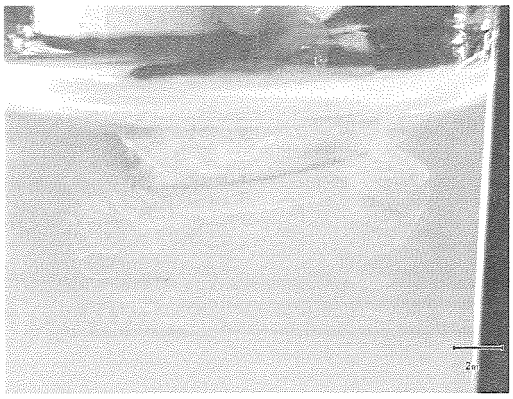
انجام می شد، ثانیاً پنج گروه لوله کشت شده با هم کشت نشدند بلکه با فاصله یک هفته تا ۱۰ روز از یکدیگر کشت شدند و هر بار سعی شد مراحل با دقت بیشتری انجام شود ولی ظهور آلودگی در هر پنج گروه تقریباً به یک میزان بود، و ثالثاً آن لوله های معدودی هم که به ظاهر آلودگی نشان نمی دادند پس از چند بار واکشت یا انتقال به محیط ریشه تدریجاً آلودگی باکتریایی مذکور در آنها ظاهر می شد.

این آلودگی باکتریایی به تدریج ماهیت محیط کشت را تغییر داده رنگ آن را کاملاً کدر می کند و محیط را از حالت ژل به صورت آبکی تبدیل می کند(عکس C ۳-۴). همزمان سرعت رشد ریزنمونه و جوانه های روی آنرا کند کرده، نهایتاً اگر میزان آلودگی زیاد باشد پس سه هفته باعث قهوه ای شدن و پوسیدگی کل ریزنمونه می شود. درکل از آنجا که این هاله فقط دور ریزنمونه رشد می کند و در داخل محیط پخش نمی شود، به نظر می رسد که ارتباط نزدیکی با بافت ریزنمونه داشته باشد. به علاوه سرعت پایین انتشار هاله باکتری در محیط نشان می دهد که این محیط، محیط مطلوب برای رشد این باکتری نمی باشد.

این آلودگی باعث شد در هر کدام از گروه های کشت شده بین ۱ تا ۳ ریزنمونه و پیازچه های روی آنها کاملاً از بین بروند. در کل هر بار که ریزنمونه ها و یا پیازچه ها به محیط جدید منتقل می شدند، در هفته اول که هنوز آلودگی تکثیر نشده بود به خوبی معلوم بود که ریشه ها یا فلس ها از رشد مناسبی برخوردارند ولی با ظهور آلودگی کاهش سرعت رشد کاملاً محسوس بود.



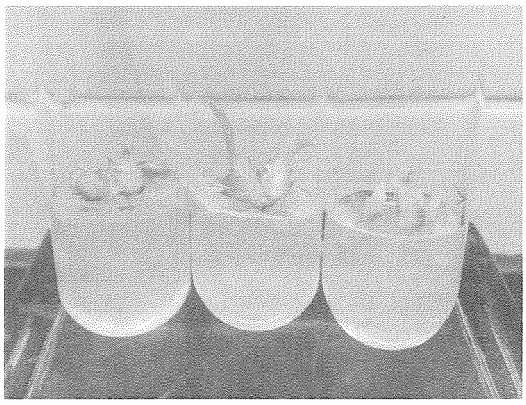
برای شناسایی این آلودگی باکتریایی یک نمونه از لوله های آلوده به یک آزمایشگاه پاتوبیولوژی فرستاده شد و پس از سه هفته کشت باکتری و انجام تست های مختلف، باکتری از گونه کلبسیلا (*Klebsiella*) شناسایی شد.



(a)



(b)



(c)



(d)

عکس۳-٤ : نمونه ای از یک محیط آلوده در نمای جانبی (a) و نمای سطحی محیط (b). تغییر رنگ تدریجی محیط آلوده و از بین رفتن گیاهچه (c). رشد محدود آلودگی اطراف گیاهچه (ریشه های جدید داخل محیط) (d).

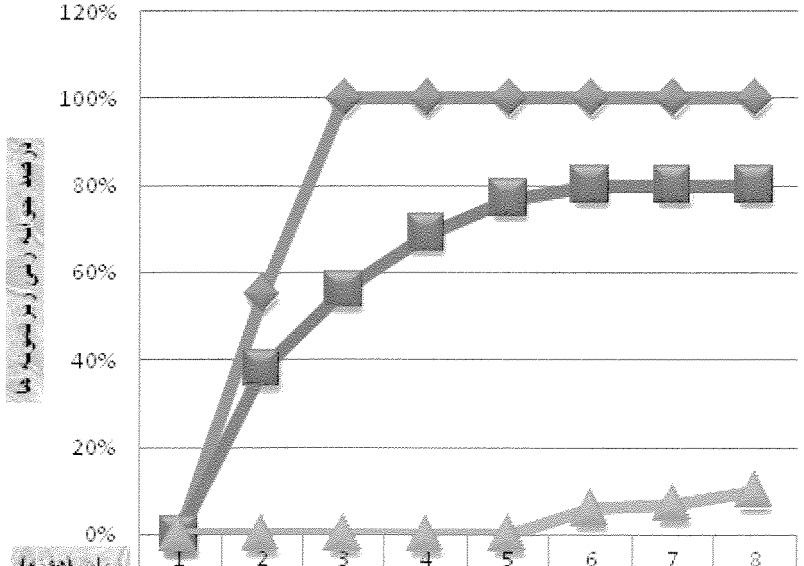


۴.۲. مرحله دوم : از کشت ریزنمونه تا تولید گیاهچه

۴.۲.۱. مقایسه سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor"

در این قسمت، نتایج حاصل از میزان ریزنمونه های جوانه زده در هر سه گونه لیلیوم و همچنین میانگین تعداد پیازچه هایی که از ریزنمونه های هر یک از سه گونه حاصل شده است ذکر می گردد. از آنجائیکه هر پیازچه اگر در شرایط مناسب نگهداری شود قابلیت تبدیل شدن به یک گیاهچه را دارد، متوسط تعداد پیازچه های حاصل از هر ریزنمونه در واقع بیانگر قدرت باززایی آن ریزنمونه در تولید تعدادی گیاهچه در یک دوره زمانی معین می باشد.

نمودار ۴-2 : مقایسه میزان جوانه زنی ریزنمونه های سه گونه لیلیوم در یک دوره هشت هفته ای



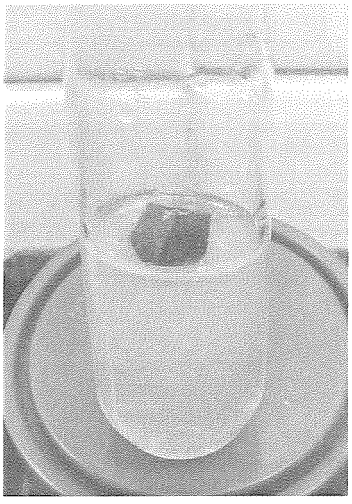
زمان (هفته)	1	2	3	4	5	6	7	8
Oriental Hybrid Lily "Acapulco"	0%	55%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Longiflorum-Asiatic (L.A.) Hybrid Lily "Cebeco Dazzle"	0%	38%	56%	69%	77%	80%	80%	80%
Asiatic Lily " Tresor"	0%	0%	0%	0%	0%	6%	7%	10%

همانطور که از مقایسه سه منحنی نمودار ۲-۴ به وضوح پیداست، در گونه اول بیش از نیمی از ریزنمونه ها (۵۵ ٪) پس از ۲ هفته جوانه های قابل رویتی تولید نموده اند در مقابل در گونه دوم پس از گذشت همین زمان فقط ۳۸ ٪ ریزنمونه ها جوانه تولید نموده اند. در گونه سوم هم تا هفته پنجم از جوانه خبری نیست. در واقع در گونه سوم از ۱۰۰ لوله (و ریزنمونه) غیر آلوده، تعداد ۸۱ ریزنمونه در طی ۵ هفته اولیه دچار فرآیندی به نام "قهوه ای شدن[1]" گردیدند و از بین رفتند و در نتیجه حذف گردیدند (عکس ۴-۴). (برای توضیح کامل در مورد این فرآیند به قسمت "بحث"رجوع شود).

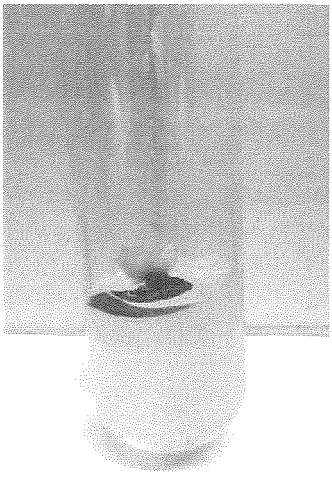
مشخصاً از هفته سوم به بعد کل ریزنمونه های گونه اول جوانه دار شدند. به علاوه هیچ ریزنمونه ای قهوه ای و حذف نشد. در حالیکه در گونه دوم فرآیند تولید جوانه تدریجاً افزایش پیدا کرده و نهایتاً در هفته ششم به بیشترین میزان خود یعنی ۸۰ ٪ ریزنمونه ها رسید. بقیه ۲۰ ٪ ریزنمونه های این گونه قهوه ای شده و حذف شدند. در گروه سوم نیز اولین جوانه ها در هفته ششم ظاهر شد و نهایتاً فقط ۱۰ ٪ ریز نمونه ها پس از ۸ هفته تولید جوانه نمودند و ۹۰ ٪ بقیه قهوه ای و حذف شدند.

[1] Browning

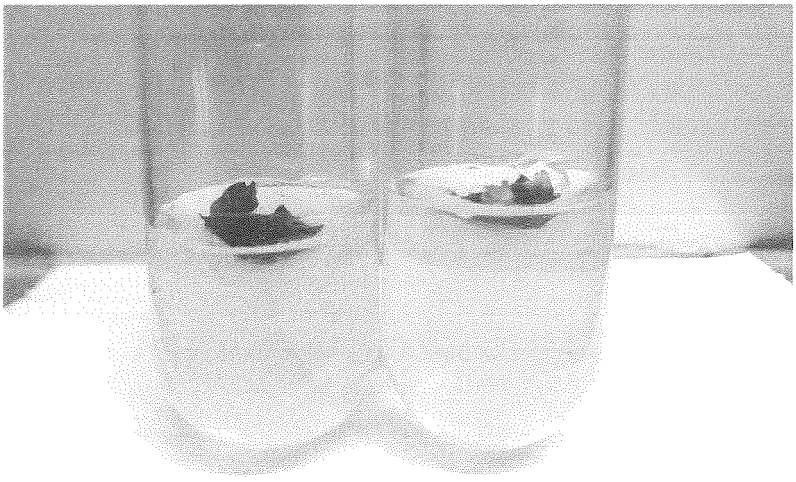




(a)



(b)

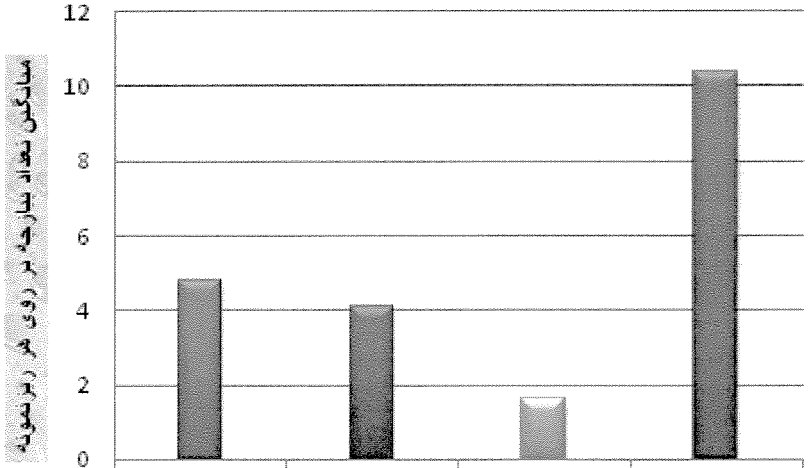


(c)

عکس ٤-٤ : بعضی از ریزنمونه ها در همان هفته های اول پس از کشت بدون هیچگونه تولید جوانه ای قهوه ای می شدند (a). بعضی نیز حتی پس از اینکه پیازچه هایی تولید می کردند قهوه ای شده و تدریجاً باعث تغییر رنگ محیط هم می شدند (b). مقایسه محیط تغییر رنگ یافته و تغییر نیافته گرچه در هر دو ریزنمونه و جوانه های آنها قهوه ای شده و مرده اند (c).

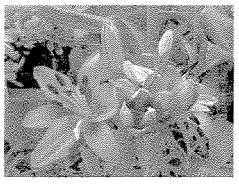


نمودار ۳-۴ : مقایسه میانگین تعداد پیازچه بر روی هر ریزنمونه سه گونه لیلیوم مورد آزمایش پس از چهار هفته

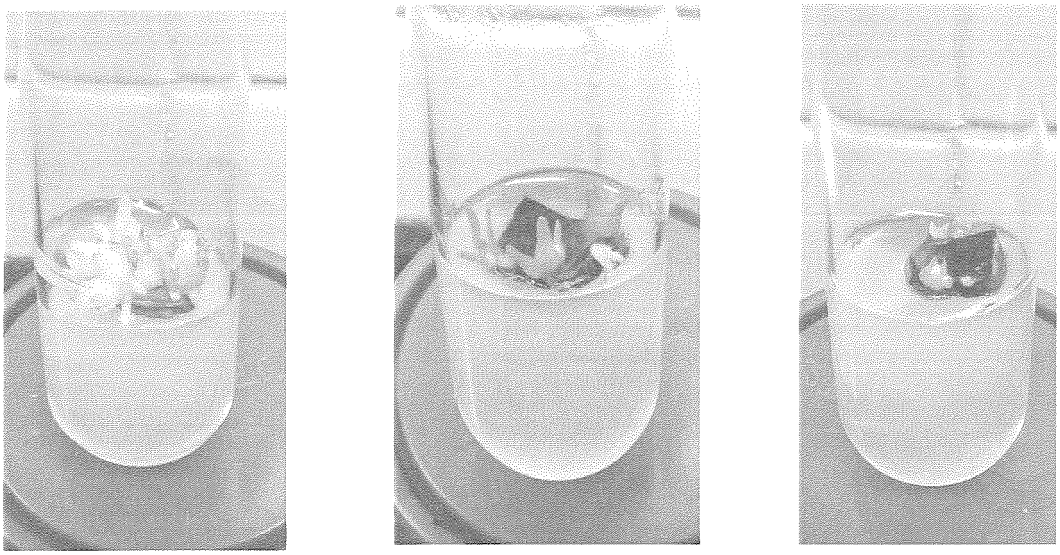


برای توضیح بیشتر در مورد ستون چهارم این نمودار که مربوط به میانگین تعداد پیازچه بر روی کالوس های حاصل از لیلیوم گونه دوم بوده و به جهت مقایسه در نمودار لحاظ شده، به متن صفحه بعد رجوع شود.

نمودار ۳-۴ یک نمودار ستونی می باشد که در آن پس از ۴ هفته، میانگین تعداد پیازچه ها بر روی ۱۰ ریزنمونه ی هر گونه که به طور تصادفی انتخاب شده اند ، نشان داده شده است. ریزنمونه های گونه های اول و دوم بر روی محیط MS که حاوی ۰/۱ mg/l BA و ۰/۱ mg/l NAA بودند، کشت شدند و ریزنمونه های گونه سوم نیز بر روی محیط پایه MS و بدون هورمون رشد، کشت شد. ستون چهارم مربوط به تعداد پیازچه هایی می باشد که بر روی کالوس های حاصل از ریزنمونه های گونه دوم، تشکیل شده اند.



مقایسه دوستون اول با ستون سوم به وضوح تأثیر حضور و عدم حضور هورمون های محرک رشد را در تولید تعداد پیازچه بیشتر نشان می دهد؛ در گونه اول متوسط تعداد پیازچه پس از چهار هفته ۴/۸، در گونه دوم۴/۱، ولی در گونه سوم فقط ۱/۶ بوده است (عکس ۵-۴). مقایسه ستون چهارم با سایر ستون ها بیانگر این واقعیت است که پتانسیل جوانه زنی و تولید پیازچه کالوس (۱۰/۴) به مراتب بیشتر و بیش از دو برابر یک ریزنمونه می باشد (عکس c و b ۶-۴).



(a) (b) (c)

عکس ٥-٤ : پیازچه های حاصل از گونه "Acapulco" (a)، گونه "Ceb Dazzle" (b)، و گونه "Tresor" (c) سه هفته پس از کشت ریزنمونه های آنها در محیط MS.

تشکیل این کالوس ها در واقع کاملاً به صورت تصادفی اتفاق افتاد، به این صورت که همانطوریکه در قسمت روش ها نیز ذکر شد، هر ۴ هفته یکبار همه ریزنمونه های هر گونه به محیط جدیدی با غلظت همان محیط قبلی واکشت می شدند. ولی گونه دوم (که پس از اتمام ۴ هفته به فلاسک های کشت انتقال یافتند و جریان آلودگی و ضد عفونی

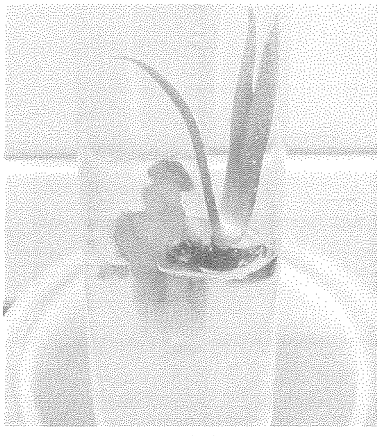
مجدد برای آنها پیش آمد)، به جای انتقال به محیطی با همان غلظت قبلی هورمون های رشد (نسبت ۱ : ۱ اکسین به سایتوکینین) درون محیطی با نسبت ۱ :۵ اکسین به سایتوکینین یعنی ۰/۱ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA کشت شدند. از آنجائیکه سایتوکینین ها موجب ازدیاد تقسیم سلولی شده و رشد طولی سلول ها را نیز سبب می شوند، این افزایش ۵ برابری BA به وضوح باعث شد که در همان هفته اول پس از انتقال گیاهچه های موجود بر روی ریزنمونه ها بیش از ۱۰ mm رشد طولی داشته باشند. ولی به تدریج و از اواسط هفته ششم بود که توده های سلولی غیر تمایز یافته ای به رنگ سبز روشن از کناره ریزنمونه ها شروع به رشد نمودند و در اواخر هفته هشتم به برآمدگی های قهوه ای رنگی که اندازه آنها چندین برابر ریزنمونه ای اولیه بود که از آن منشا می گرفتند، تبدیل شدند(عکس a ۶-۴).



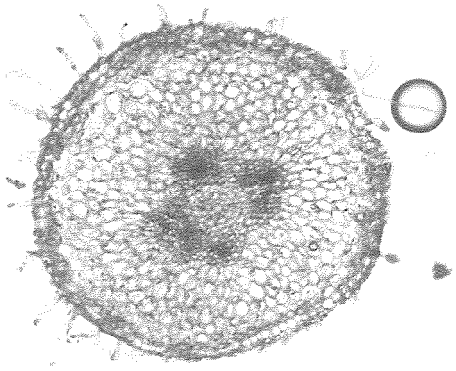
(a) (b) (c)

عکس ٦-٤ : کالوس تشکیل شده از یک ریزنمونه "Ceb Dazzle" و گیاهچه های تشکیل شده بر روی همان ریزنمونه

از این توده های سلولی سریع الرشد که اصطلاحاً کالوس نامیده می شوند، حدوداً پس از دو هفته جوانه هایی ظاهر شدند که به سرعت به پیازچه تمایز یافته و شروع به رشد کردند. در اغلب موارد جوانه ها پیازچه های طبیعی ایجاد می کردند که از آنها گیاهچه های سالم و بلندی حاصل می شد ولی به ندرت گیاهچه هایی با برگ های چروکیده و پیچ خورده نیز دیده می شدند که پس از چند روز رشد نیز زرد شده و خشک می شدند. در بعضی موارد نیز دیده می شد که از یک کالوس چندین زائده قطور و بلند سفید رنگ، به داخل محیط کشت به سرعت رشد می کرد (عکس a ۷-۴). در یک مورد پس از مقطع گیری از این زوائد و بررسی ساختمان بافت مورد نظر در مقطع عرضی (عکس b ۷-۴)، مشخص شد که آنها دارای ساختار ریشه های جوان بوده و بدون شک ریشه های نا به جا و پیش رسی هستند که در زیر یکی از جوانه ها که معمولاً هم غیر طبیعی می باشد (عکس a ۷-۴) تمایز یافته و شروع به رشد سریع می کنند.



(a)



(b)

عکس ۷-٤ : گاهی در کنار یک گیاهچه طبیعی اشکال غیر طبیعی و کالوس-مانند هم رشد می کرد (a). مقطع عرضی از زوائد ریشه-مانند همان گیاهچه غیر طبیعی در شکل a (b).



۴.۲.۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss

جدول ۱-٤: نتایج حاصل از بررسی پنج گروه کشت شده از ریزنمونه های سوسن چلچراغ پس از ۱۰ هفته

غلظت هورمون (میلی گرم در لیتر)	میزان جوانه زنی ریزنمونه ها (درصد)	میانگین تعداد پیازچه بر روی هر ریز نمونه	میزان پیازچه های ریشه دار (درصد)	میانگین تعداد فلس در هر پیازچه	میانگین وزن تر هر پیازچه (میلی گرم)	تعداد کل توده های کالوس
Control	۱۰۰	۲/۱۷	۲۴/۵	۳/۷	۵۲	–
۰/۱ BA	۱۰۰	۳/۳۳	۱۵/۶	۵/۲	۹۷/۸	۱۲
۱ BA	۶۶/۷	۱/۵	–	۵	۶۹/۲	۲۰
۰/۱ NAA	۱۰۰	۳/۵	۵۹	۴/۴	۹۹/۲	۱۸
۱ NAA	۶۶/۷	۱/۵	۵۰	۵	۱۱۰/۳	۳۸



۴.۲.۲.۱. تأثیر هورمون های رشد بر شکل فلس و پیازچه

پیازچه های تشکیل شده بر روی محیط بدون هورمون دارای فلس هایی قطور بودند که کاملاً حالت ذخیره ای[1] را نشان می دادند (عکس a ۸-۴). این شکل فلس در پیازچه های حاصل از محیط های حاوی غلظت های NAA هم دیده می شد(عکس e و d ۸-۴). ولی در محیط حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BA (تمامی وزن ترکیباتی که در این تحقیق ذکر می شوند در یک از لیتر محلول حل شده اند) فلس ها تقریباً نازک شده و حالت نیمه برگی شکل، نیمه ذخیره ای و نوک تیز[2] به خود گرفتند (عکس b ۸-۴) و در غلظت ۱ میلی گرم BA فلس ها کاملاً به صورت غیر ذخیره ای[3]،برگی شکل و spiky رشد کردند (عکس c ۸-۴). البته به طور کلی پیازچه های تشکیل شده در غلظت های بالای هورمونی (1 BA , 1 NAA) شکل طبیعی و حالت پیازچه ای خود را از دست می دادند که این فرایند در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA بسیار واضحتر بود.

تفاوت عمده ای که بین پیازچه های حاصل از سوسن چلچراغ و سه گونه قبلی لیلیوم به چشم می خورد این بود که پیازچه های گونه چلچراغ برخلاف سه گونه قبلی که هر سه در لوله برگ های نسبتاً بلند و کشیده ای تولید کردند، تقریباً رشد برگ (عوامل فتوسنتز کننده) در هیچ کدام از غلظت ها دیده نشد بلکه رشد بیشتر به صورت افزایش وزن پیازچه و تعداد فلس ها بود.

---

[1] Fleshy

[2] Spiky

[3] Non fleshy





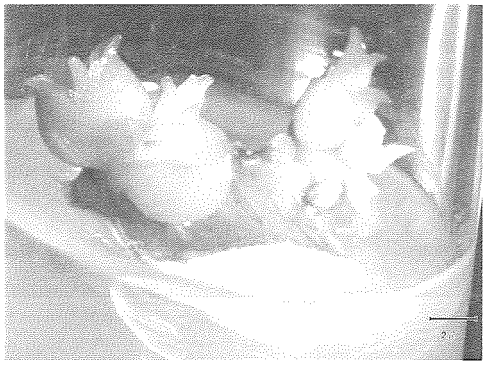
(a)



(b)



(c)



(d)



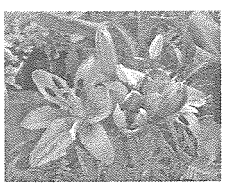
(e)

عکس ۸-٤ : پیازچه های حاصل از ریزنمونه های گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss پس از ده هفته کشت در محیط MS حاوی (a) Control . (b) 0.1 mg/l BA ، (c) 1 mg/l BA ، (d) 0.1 mg/l NAA و (e) 1 mg/l NAA .



۴.۲.۲.۲. تأثیر هورمون های رشد بر میزان پیازچه زایی، تعداد فلس، و وزن پیازچه

اضافه نمودن ۰/۱ میلی گرم هورمون BA در محیط کشت باعث افزایش قدرت پیازچه زایی ریزنمونه های کشت شده نسبت به محیط کنترل شد. به علاوه گرچه فلس های پیازچه های این غلظت کمی نازک شده و حالت برگی شکل پیدا کردند ولی از آنجا که تعداد فلس های پیازچه ها افزایش یافت (۵/۲ نسبت به ۳/۷) وزن تر پیازچه های این غلظت نیز نسبت به محیط کنترل افزایش محسوسی پیدا نمود. افزایش ۱۰ برابری هورمون BA باعث شد که تعداد پیازچه های تشکیل شده بر روی هر ریزنمونه حتی نسبت به محیط کنترل هم کم تر شود (۱/۵ نسبت به ۲/۱۷). میانگین تعداد فلس ها گرچه در هر دو غلظت BA تقریباً یکسان بود ولی از آنجائیکه فلس های پیازچه های رشد داده شده در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA، همانطور که ذکر شد کاملاً نازک بوده و حالت برگی شکل داشتند، وزن تر پیازچه های آن از وزن تر پیازچه های غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر BA کمتر بود (۶۹/۲ نسبت به ۹۷/۸). مشخصاً بیشترین تعداد پیازچه بر روی یک ریزنمونه، در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA حاصل شد که در این غلظت هم گرچه تعداد فلس پیازچه های آن از فلس های محیط های حاوی BA کمتر بود ولی به دلیل اینکه فلس های آن قطورتر و شکل ذخیره ای داشتند وزن تر پیازچه های این غلظت از هر دو غلظت BA بیشتر بود. افزایش ۱۰ برابری غلظت هورمون NAA هم مانند افزایش هورمون BA اثر مهاری در تعداد پیازچه های تشکیل شده بر روی هر ریزنمونه نسبت به محیط کنترل و غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA داشت. ولکن پیازچه های حاصل در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر NAA با داشتن تعداد فلس بیشتر (۵) نسبت به غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر آن (۴/۴)، میانگین وزن تر



بیشتری داشتند و در واقع سنگین ترین پیازچه ها در این غلظت حاصل شدند (۱۱۰/۳ میلی گرم).

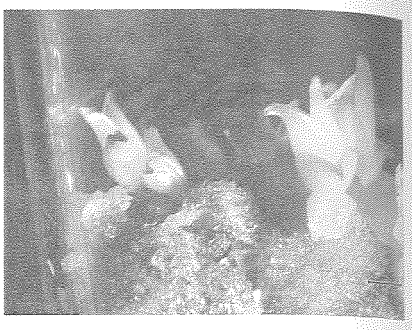
۴.۲.۲.۳. تأثیر هورمون های رشد بر کالوس زایی

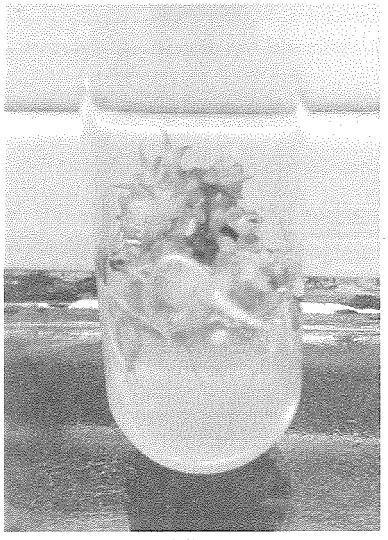
در محیط کنترل هیچ توده کالوسی تشکیل نشد. توده های کالوسی که در محیط حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BA تشکیل شدند بسیار کوچک بودند و افزایش ۱۰ برابری BA به ۱ میلی گرم در لیتر باعث تشکیل توده های بزرگتر و بیشتر شد. کلاً در این توده های بزرگ به ندرت تمایز یابی بافت کالوس به پیازچه دیده می شد (عکس b ۹-۴). در محیط حاوی NAA در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر تعداد ۱۸ توده کالوس تشکیل شد که اکثر آنها در مقایسه با کالوس های غلظت BA ۰/۱ کاملاً بزرگتر ولی از کالوس های غلظت BA ۱ کوچکتر بودند؛ و بلاخره در محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر NAA بزرگترین کالوس ها تشکیل شدند. نکته قابل توجه اینکه بر روی کالوس های حاصل از محیط حاوی هورمون NAA، برعکس محیط های حاوی BA، تعداد زیادی پیازچه تشکیل شده بود (عکس c,e و a,d ۹-۴) که این پیازچه ها اکثراً به خوبی رشد کرده و فلس های درشت و ذخیره ای تولید کردند.




(a)


(b)


(c)


(d)


(e)

عکس ۹-٤ : کالوس های حاصل از ریزنمونه های گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss و پیازچه های تشکیل شده بر روی آنها پس از ده هفته کشت در محیط MS حاوی 0.1 mg/l NAA (d),(a)، 1 mg/l BA (b)، و 1 mg/l NAA (e),(c).



جدول ۲-٤ : بیشترین تعداد پیازچه تشکیل شده بر روی کالوس های گونه سوسن چلچراغ در غلظت های هورمونی مختلف

غلظت هورمون (میلی گرم در لیتر)	بیشترین تعداد پیازچه تشکیل شده بر روی کالوس
Control	-
۰/۱ BA	-
۱ BA	۲
۰/۱ NAA	۱۱
۱ NAA	۶

۴.۲.۲.۴. تأثیر هورمون های رشد بر ریشه زایی

ریشه زایی در محیط بدون هورمون هم انجام شده بود (۲۴/۵ ٪) (عکس a ۸-۴) به این صورت که پیازچه هایی که رشد بیشتری کرده بودند (به دلیل اینکه زودتر تشکیل شده بودند) ریشه های کوتاهی به طول ۳ تا ۵ میلی متر تشکیل دادند ولی در پیازچه های کوچکتر اثری از ریشه نبود. انتقال پیازچه های ریشه دار به محیط کنترل برای مدت یک ماه دیگر فقط باعث رشد بسیار ناچیزی در طول ریشه های موجود شد. حضور هورمون BA به طور وضوح باعث مهار ریشه زایی شده به طوریکه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA اصلاً

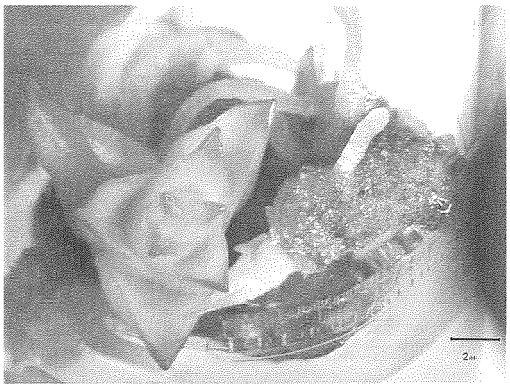


ریشه ای تشکیل نشد(عکس ۸c-۴)؛ ریشه های ایجاد شده در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر آن نیز بسیار کوتاه بود (۱۵/۶ ٪ رشه زایی). در محیط حاوی هورمون NAA در هر دو غلظت از همان ابتدای ظهور پیازچه ها، ریشه هایی هم ظاهر شدند که البته طول و تعداد آنها در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر بیشتر بوده (عکس d ۹-۴) و مورفولوژی طبیعی تری هم نسبت به غلظت ۱ میلی گرم در لیتر داشتند. نکته دیگر اینکه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر NAA گرچه تعداد زیادی ریشه تشکیل شده بود ولی این ریشه ها کاملاً به صورت نا به جا یعنی مستقیماً از خود بافت کالوس تمایز یافته بودند و با هیچ پیازچه ای در ارتباط نبودند (عکس ۱۰-۴).

جدول ۳-٤ : بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه حاصل از گونه سوسن چلچراغ در غلظت های هورمونی مختلف

غلظت هورمون (میلی گرم در لیتر)	بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه
Control	۲
۰/۱ BA	۱
۱ BA	-
۰/۱ NAA	۶
۱ NAA	۶





(a)



(b)

عکس ۱۰-٤ : تشکیل ریشه های نابه جا از خود کالوس که با پیازچه در ارتباط نیستند در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر NAA در یک ریزنمونه (a) هفته ششم و (b) همان ریزنمونه در هفته دهم.

۴ . ۳ . مرحله سوم : ریشه زایی

۴.۳.۱. مقایسه سه گونه "Acapulco" ، "Cebeco Dazzle" ، و "Tresor "

پس از به دست آوردن گیاهچه هایی که ۵-۳ cm طول داشته و بسیاری از آنها ریشه های خیلی ریز و کوتاهی نیز ایجاد کرده بودند لازم بود که این ریشه های ریز به ریشه های بلند و قطوری تبدیل شوند تا پس از انتقال دادن این گیاهچه ها به خاک ، قدرت بازجذب مواد مغذی خاک را داشته و نهایتاً گیاه، زنده و شاداب باقی بماند و رشد کند.

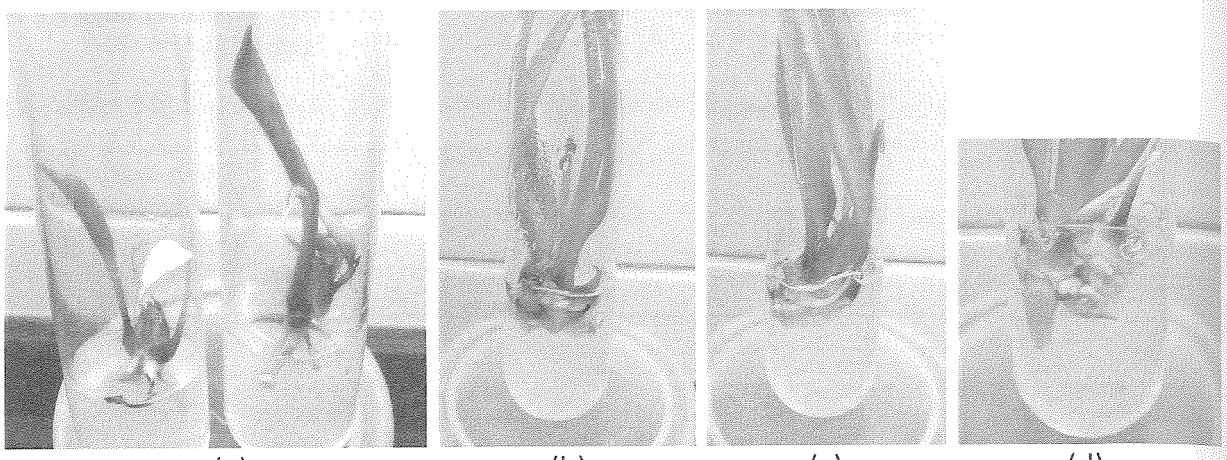
بر اساس آنچه در قسمت مربوط به روش ها ذکر گردید برای ریشه زایی، گیاهچه های هر سه گونه را ابتدا به مدت ۴ هفته در محیط MS جدیدی که نسبت هورمونی اکسین به سایتوکینین آن ۱ به ۱۰ بود (۰/۱ mg/l NAA : ۱ mg/l BA) کشت شدند. سپس این



گیاهچه ها را به دو قسمت تقسیم کرده و نیمی از آنها را به محیط کشت دیگری که حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر از یک اکسین دیگر به نام IBA بود منتقل کرده و نیم دیگر در غلظت دو برابر همین هورمون یعنی NAA ۱ mg/l کشت شدند تا برای مدت چهار هفته دیگر به رشد خود در این محیط ها ادامه دهند.

از آنجائیکه اکسین ها هورمون های محرک ریشه زایی هستند، انتظار می رفت که پس ازچهار هفته غلظت بالای اکسین موجود در اولین محیط باعث تحریک ریشه زایی و رشد طولی مناسب در ریشه های جدید در هر سه گونه لیلیوم کشت شده باشد؛ ولی همانطور که در جدول ۴-۴ نشان داده شده است، پس از اندازه گیری طول بلندترین ریشه های حاصل از پیازچه های هر سه گونه در انتها ی هفته چهارم، میزان رشد نسبتاً ناچیزی در همه آنها مشاهده شد (عکس ۱۱a,b,c-۴)؛ بدین ترتیب که گونه اول دارای میانگین ۳ میلی متر، گونه دوم ۵ میلی متر و گونه سوم ۴ میلی متر رشد طولی ریشه شد. به علاوه بیشترین تعداد ریشه هایی که در پیازچه های گونه های اول تا سوم مشاهده شد به ترتیب ۴،۳ و۳ بود که این تعداد هم در مقایسه با آنچه که در محیط ریشه زای بعدی به دست آمد چشمگیر نبوده و در حدود نصف آن بود. نکته دیگری که مشاهده شد این بود که محیط مذکور در غلظت هورمونی به کار گرفته شده در فاصله چهار هفته کالوس زایی را نیز تحریک کرده و گاهی باعث رشد توده های قطور و غیر طبیعی در انتهای گیاهچه شده که به نظر شبیه ریشه بودند (عکس ۱۱ d-۴).





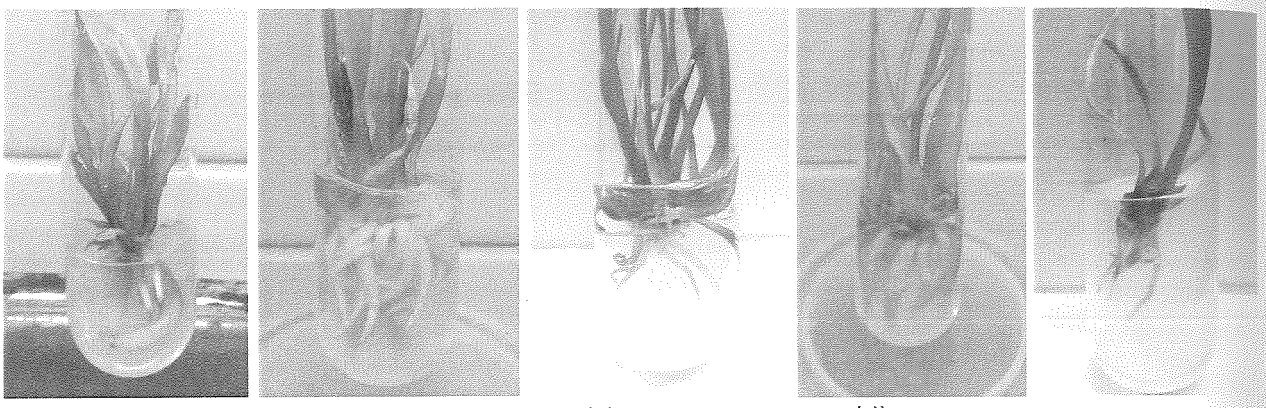
(a) (b) (c) (d)

عکس ۱۱- ٤ : میزان ریشه زایی هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش پس از چهار هفته کشت در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BA و ۱ میلی گرم در لیتر NAA (a) "Acapulco"، (b) "Ceb Dazzle"، و (c) "Tresor". (d) رشد توده ای قطور و نا مشخص در این محیط در یک گیاهچه Dazzle

از آنجائیکه این اکسین به کار گرفته شده اثر رضایت بخشی بر روی ریشه زایی گیاهچه های کشت شده نداشت تصمیم بر آن شد که از اکسین دیگری برا ی این کار استفاده شود که پس از بررسی و مطالعه هورمون IBA در غلظت های مذکور استفاده شد. نتیجه هم آنچنان که در جدول ۴-۴ مشاهده می شود کاملاً رضایت بخش بود؛ IBA در هر دو غلظت خود باعث تحریک مناسب رشد طولی ریشه های موجود شده و طول آنها را چندین برابر افزایش داد. به علاوه مقایسه بیشترین تعداد ریشه ای که در یک پیازچه هر یک از سه گونه لیلیوم مورد آزمایش ثبت شد ، که بیش از دو برابر این تعداد در محیط قبلی بود، به خوبی قدرت این اکسین جدید را برای تحریک گیاهچه ها به تولید ریشه های جدید نشان داد. نکته قابل ملاحظه دیگر اینکه در هیچ یک از دو غلظت این هورمون رشد توده های غیر طبیعی و یا کالوس زایی که در واقع بافت هایی مزاحم در این مرحله می باشند دیده نشد.



از طرفی مقایسه نتایج حاصل از دو غلظت IBA نشان داد که این هورمون در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر (عکس a,b,d ۱۲-۴) تقریباً رشد طولی ریشه را در هر سه گونه (۲۶، ۳۱، و۲۷ میلی متر) تا دو برابر غلظت ۱ میلی گرم در لیتر آن (۱۵، ۱۸، و ۱۳ میلی متر) تحریک کرد (عکس c,e ۱۲-۴). ولی در بیشترین تعداد ریشه تشکیل شده بر روی یک پیازچه اختلاف چندانی در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر آن (۶، ۱۱، ۷) نسبت به ۱ میلی گرم در لیتر (۶، ۹، ۶) دیده نشد.



عکس ۱۲- ٤ : میزان ریشه زایی و افزایش رشد طولی پس از انتقال گیاهچه های هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش به محیط های MS حاوی ۰/۵ (a, b, d) و ۱ میلی گرم در لیتر IBA (c , e) به مدت چهار هفته دیگر. (a) گیاهچه "Acapulco"، (b و c) گیاهچه "Ceb Dazzle"، (d و e) گیاهچه "Tresor"

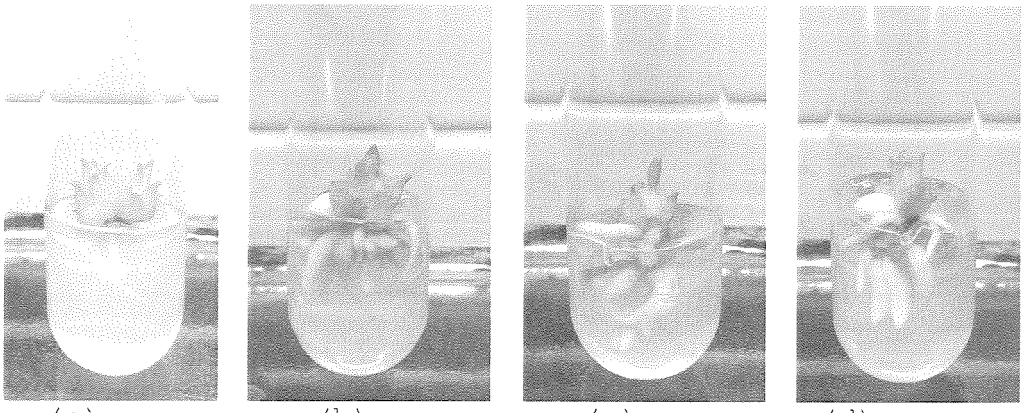
جدول ٤-٤: میانگین طول بلندترین ریشه های حاصل از ١٠ گیاهچه ریشه دار شده (میلی متر) و بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه حاصل از سه گونه لیلیوم مورد آزمایش در انتهای یک دوره چهار هفته ای رشد

گونه لیلیوم	غلظت هورمون (mg/l)	میانگین طول بلندترین ریشه های حاصل از ١٠ گیاهچه ریشه دار شده (میلی متر)	بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه
Oriental Hybrid "Acapulco"	٠/١ BA + ١ NAA	٣	٣
	٠/٥ IBA	٢٦	٦
	١ IBA	١٥	٦
L.A Hybrid "Cebeco Dazzle"	٠/١ BA +١ NAA	٥	٤
	٠/٥ IBA	٣١	١١
	١ IBA	١٨	٩
Asiatic Lily "Tresor"	٠/١ BA +١ NAA	٤	٣
	٠/٥ IBA	٢٧	٧
	١ IBA	١٣	٦



۴.۳.۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss

غلظت ۰/۵ میلی گرم IBA در محیط به خوبی باعث تولید ریشه های جدید (تا تعداد ۸ ریشه در یک پیازچه) با رشد طولی مناسب گردید (میانگین ۱۷ میلی متر). به علاوه باعث تحریک رشد طولی در ریشه های کوچک قبلی هم شد. هیچ گونه کالوس زایی در طی این مدت در این محیط ملاحظه نگردید (عکس b ۱۳-۴). در هر دو غلظت ۰/۱ و ۱ میلی گرم در لیتر NAA هم که در آنها قبلاً به خوبی ریشه زایی انجام شده بود در این چهار هفته کمتر ریشه زایی انجام گردید ولکن بیشتر بر طول ریشه های موجود افزوده شد. گرچه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر NAA (عکس d ۱۳-۴) رشد طولی بیشتری (۲۰ میلی متر) در مقایسه با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر آن (عکس c ۱۳-۴) حاصل شد (۱۵ میلی متر) ولی بر خلاف غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر، مقادیر زیادی هم توده کالوسی ایجاد شد.



عکس ۱۳- ٤ : پیازچه های ریشه دار شده سوسن چلچراغ پس از چهار هفته در محیط MS حاوی 1 mg/l NAA (d) ، 0.1 mg/l NAA (c) ، 0.5 mg/l IBA (b) ، control (a)



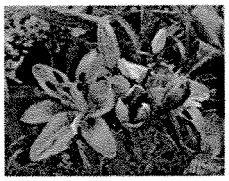
جدول ٥- ٤ : میانگین طول بلندترین ریشه های حاصل از ١٠ گیاهچه ریشه دار شده (میلی متر) و بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه حاصل از سوسن چلچراغ در انتهای یک دوره چهار هفته ای رشد در سه محیط ریشه زایی به کار گرفته شده

غلظت هورمون (میلی گرم در لیتر)	میانگین طول بلندترین ریشه های حاصل از ١٠ پیازچه ریشه دار شده (میلی متر)	بیشترین تعداد ریشه در یک پیازچه
٠/٥ IBA	١٧	٨
٠/١ NAA	١٥	۶
١ NAA	٢٠	۶

۴ . ۴ . مرحله چهارم و پنجم : انتقال به خاک و سازگاری

۴.۴.۱. مقایسه سه گونه "Acapulco" ، "Cebeco Dazzle" ، و "Tresor"

پس از ریشه دار کردن گیاهچه ها، نوبت انتقال آنها از یک محیط کاملاً مصنوعی و داخل لوله آزمایش به خاک بود. کلاً تعداد ٣٠ گلدان از هر یک از سه گونه مورد آزمایش کاشته شد.



به طور کلی هر گیاهی قبل از کاشته شدن در خاک باید طول مناسبی از ریشه را داشته باشد تا بتواند مواد مغذی خاک را به میزان لازم برای رشد و حیات خود بازجذب نماید. در کشت بافت گیاهی نیز همین شرایط حکم فرماست؛ گیاهچه ای که قبلاً در لوله آزمایش و در یک محیط مصنوعی بسیار غنی قرار داشته و به راحتی مواد غذایی را از طریق انتشار جذب می کرده حال پس از انتقال به خاک تنها می تواند این مواد مغذی را از طریق ریشه های سالم و مناسب جذب نماید. سؤالی که در این تجربه مطرح گردید این بود که طول مناسب ریشه در گیاهچه های لیلیوم برای انتقال از محیط مصنوعی به خاک چقدر است؟ برای دست یابی به جواب این سؤال تصمیم بر آن شد تا گلدان های کاشته شده در سه گروه از نظر طول ریشه با هم مقایسه گردند. هر گروه شامل ۳۰ گلدان بود و از هر گونه لیلیوم ۱۰ گلدان انتخاب شد ، بدین صورت که :

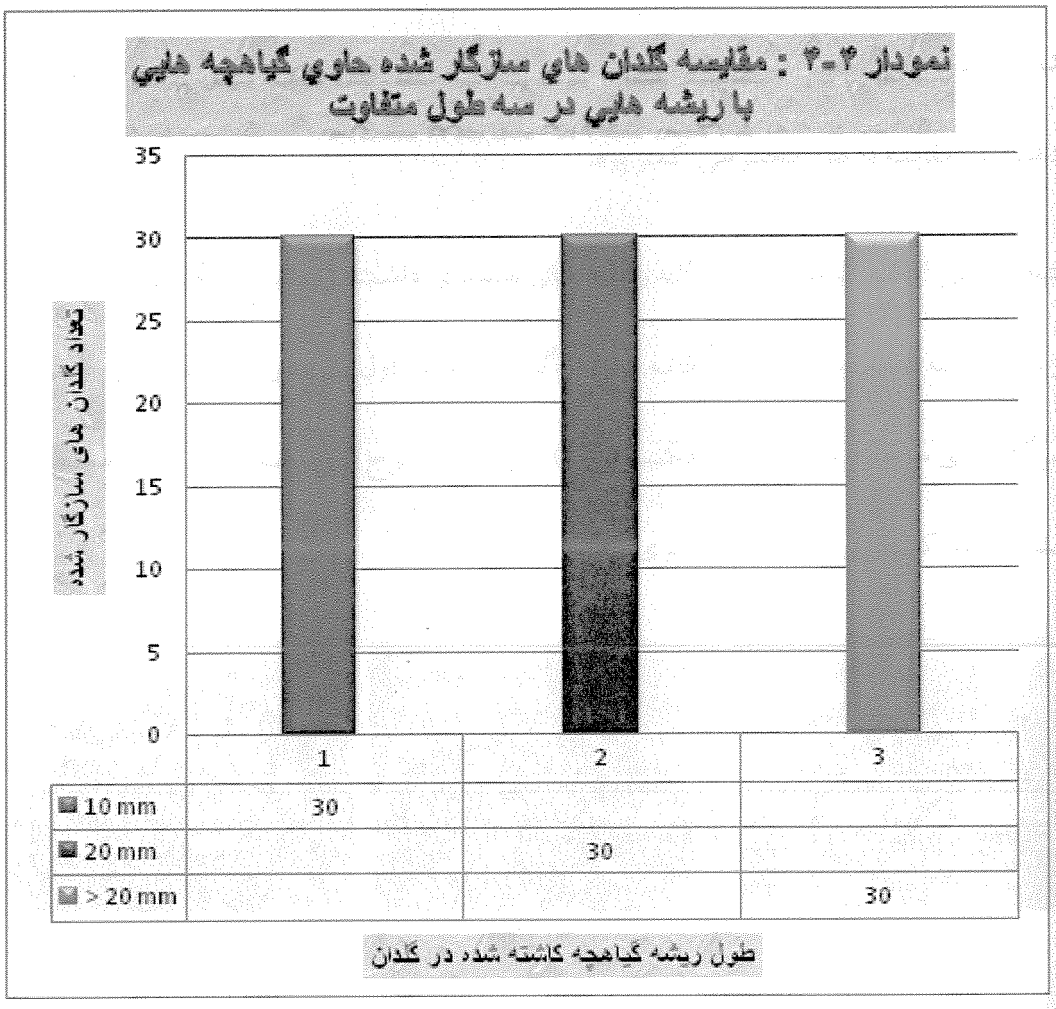
گروه اول : شامل گلدان های دارای گیاهچه هایی با ریشه هایی به طول تقریبی ۱۰ میلی متر (بین ۸ تا ۱۴ میلی متر)

گروه دوم : شامل گلدان های دارای گیاهچه هایی با ریشه هایی به طول تقریبی ۲۰ میلی متر (بین ۱۴ تا ۲۳ میلی متر)

گروه سوم : شامل گلدان های دارای گیاهچه هایی با ریشه هایی به طول تقریبی بیش از ۲۰ میلی متر (و به عبارت دقیق تر بیش از ۲۳ میلی متر)



این سه گروه به مدت ۴ تا ۵ هفته در اتاق سازگاری قرار گرفته و مراحل سازگاری را پشت سر گذاشتند و سپس به گلخانه انتقال یافتند.



آنچه که در نمودار ۴-۴ دیده می شود نشان دهنده تعداد گلدان های کاملاً سازگار شده با محیط خاک و گلخانه می باشد. مشخصاً در هر سه گروه همه ۳۰ گلدان کاشته شده به خوبی سازگاری یافته و هیچ کدام از گیاهچه ها خشک نشدند (عکس۱۴-۴).

نکته قابل ذکر اینکه در هیچ یک از گیاهچه ها، رشد طولی در برگ های موجود یا رشد جوانه و برگ جدید در فاصله ۴ هفته دیده نشد. به علاوه گرچه حتی گیاهچه هایی با طول ریشه ۸ میلی متر هم به خوبی سبز مانده و خشک نشدند ولی مشخصاً ساختار برگ



های گیاهچه هایی که در ابتدا ریشه های بلند تری داشتند پس از گذشت ۴ هفته بسیار قطورتر و پهن تر شده و رنگ آنها که در ابتدا سبز کم رنگ بود به سبز کاملاً تیره تبدیل شد. این در حالی است که این تحولات در برگ های گیاهچه هایی که ریشه های کوتاه تر داشتند در مقایسه به طور محسوسی کمتر بود.

نتیجه کلی اینکه گیاهچه هایی که ریشه های بلندتری داشتند زودتر از دیگران سازگار شده و به گلخانه انتقال یافتند. در گلخانه پس از گذشت هفته اول به تدریج رشد طولی و عرضی برگ های موجود شروع شد (عکس۱۵-۴) ولی به وضوح این رشد ابتدا در گیاهچه هایی مشاهده شد که دارای ریشه های بلندتری بودند.



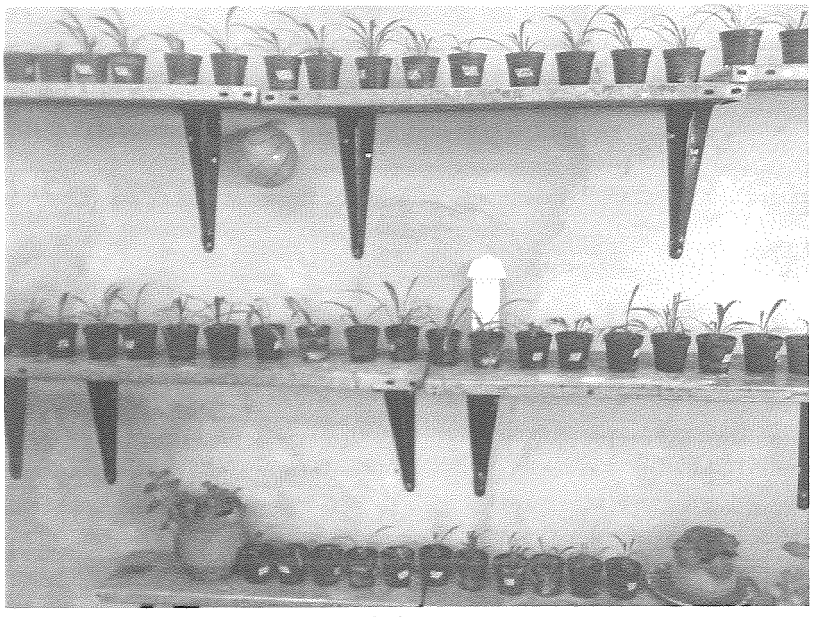
(a) (b) (c)

عکس ١٤- ٤ : گیاهچه های کاشته شده هر سه گونه لیلیوم مورد آزمایش سه هفته پس از انتقال به اتاق سازگاری (a) گیاهچه "Acapulco"، (b) گیاهچه "Ceb Dazzle"، و (c) گیاهچه "Tresor"





(a)



(b)

عکس ۱۵- ٤ : رشد کاملاً مشخص گیاهچه ها (a) سه هفته پس از انتقال به گلخانه (b)



۴.۴.۲. گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss

۲۰ گلدان کاشته شده از این گونه برای پاسخ به سؤالی که در بالا ذکر شد به دو گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند:

گروه اول : شامل گلدان های دارای پیازچه هایی با ریشه هایی به طول تقریبی ۱۰ میلی متر

گروه دوم : شامل گلدان های دارای پیازچه هایی با ریشه هایی به طول تقریبی ۲۰ میلی متر

همانطور که قبلاً ذکر شد پیازچه های سوسن چلچراغ در هنگام انتقال به محیط ریشه زایی هیچ گیاهچه برگداری تولید نکرده بودند؛ پس از ریشه زایی و هنگام انتقال به خاک نیز نشانه ای از گیاهچه برگدار نبود. هیچ یک از پیازچه های گروه اول و دوم نیز حتی پس از گذراندن دوره سازگاری (عکس a ۱۶-۴) و انتقال به گلخانه (عکس b ۱۶-۴)، گیاهچه ای تولید نکردند گرچه در همه این مراحل هیچ یک از آنها نیز خشک نشده و از بین نرفتند.



(a)

عکس ۱۶- ٤ : (a) گیاهچه (پیازچه) کاشته شده سوسن چلچراغ سه هفته پس از انتقال به اتاق سازگاری . (b) سه هفته پس از انتقال به گلخانه



نکته قابل ذکر دیگر تلاشی بود که برای بررسی قدرت سازگاری پایه های بومی سوسن چلچراغ با شرایط منطقه ای از شهرستان کرج به نام سهیلیه شد. منطقه نمونه گیری سوسن چلچراغ ارتفاعات داماش یعنی چیزی بیش از ۲۱۰۰ متر بالاتر از سطح دریا بود. نمونه گیری در اواخر اردیبهشت انجام شد. در روز نمونه گیری حوالی قبل از ظهر رطوبت منطقه حدود ۸۵ ٪ و دما حدود ۱۲ درجه بود. منطقه کاملاً سرسبز و مه گرفته با خاک بسیار حاصلخیز (عکس۱۷-۴) .



عکس ۱۷- ٤ : نمایی از روستای داماش که پایه های گیاهی از داخل حیاط یکی از همین منازل تهیه شد!

پس از نمونه گیری، سه پایه از گل ها به باغی در سهیلیه کرج (منطقه ای از کرج، دور از شهر که دارای باغات و زمین های کشاورزی فراوان بوده و دارای ارتفاع بیشتر و درجه حرارت کمتر از خود شهر است) انتقال یافتند و در گوشه ای از باغ که به دلیل حضور انبوه تر سایر گل ها و درختان، رطوبت بیشتری فراهم شده و نفوذ نور خورشید هم



کمتر بود ، در خاک کاشته شدند. در این قسمت از باغ دما در حوالی قبل از ظهر حدود ۲۲ درجه بود و رطوبت هم در حدود ۵۶ ٪. هدف این اقدام این بود که بررسی شود آیا این گل ارزشمند و در حال انقراض را اگر موفق به تکثیر آن در شرایط آزمایشگاهی شدیم، می توان در نقطه ای از شهرستان کرج در فضای آزاد و بدون نیاز به گلخانه و تجهیزات فراوان کاشت؟ به همین دلیل پایه های موجود در خاک آن منطقه کاشته شده و هر روز آبیاری شده و بررسی شدند که آیا قدرت سازگاری و ماندگاری در این آب و هوا و ارتفاع را دارند یا خیر.

نتیجه به این صورت بود که کلیه پایه ها که در ابتدا بین ۱۰ تا ۳۰ سانتی متر طول داشته و هر یک چندین غنچه داشتند پس از چهار هفته حدود ۱۰ سانتی متر رشد کرده بودند؛ غنچه ها نیز باز شده بود و گل ها ظاهر شده بودند. ولی برگ ها دچار کم آبی بوده و حالت شادابی، تردی وشکنندگی خود را از دست داده بودند و برگ های قدیمی و اولیه از پایین ساقه کاملاً زرد شده و خشک شده بودند؛ ساقه هایی که جدیداً رشد کرده بودند بسیار نازک، ضعیف و بی آب بوده و قدرت تحمل غنچه ها و گل ها را نداشتند. گل ها نیز که در شرایط بومی و طبیعی بیش از یک هفته بر روی گیاه ماندگاری دارند، در این آب و هوا فقط حدود ۲ تا ۳ روز باقی ماندند. ۱۰ روز بعد تقریباً تمام پایه ها خشک شده بودند.



نکته دیگر بررسی ماندگاری پیاز گل در داخل خاک منطقه بود. گرچه انتظار می رفت پس از خشک شدن قسمت های هوایی گیاه به دلیل عدم سازگاری، پیاز آن نیز دچار پوسیدگی شده و از بین برود ولی حدود دو ماه و نیم بعد که خاک اطراف ناحیه پیازهای کاشته شده حفر شد مشاهده گردید که نه تنها پیازها از بین نرفته اند بلکه تعدادی پیازچه جدید هم در کنار آنها تشکیل شده و شروع به رشد کرده اند.



(a) (b)

عکس ۱۸- ٤ : (a) یک پایه از گل سوسن چلچراغ چهار هفته پس از کاشته شدن در منطقه سهلیه کرج . (b) همان پایه ده روز بعد



(a)



(b)



(c)





(d)



(e)

عکس ۱۹- ٤ : نمونه ای از گل های هر چهار گونه لیلیوم مورد استفاده در این آزمایشات . سه گونه اول (a) "Acapulco" ، (b) "Ceb Dazzle" و (c) "Tresor" در گلخانه مربوط به آزمایشگاه بیولوژی پرورش داده شده و گونه چهارم (d) *L. ledebourii* (Baker) Boiss یا سوسن چلچراغ در منطقه بومی خود (ارتفاعات داماش) توسط نگارنده عکس برداری شده است .

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

استفاده از سیستم های نوین به منظور بهینه کردن تکثیر گیاهان، همراه با افزایش بهره وری اقتصادی امری ضروری به شمار می رود. بیشتر سیستم های تکثیر دارای بازدهی پایینی می باشند و مشکلاتی را در زمینه تولید ایده آل پیازچه در گلهای پیازی بوجود می آورند. همانگونه که قبلاً اشاره گردید، هدف از انجام این پروژه پیاده سازی تکنیک کشت بافت گیاهی و بررسی دقیق مراحل انجام آن (ضدعفونی سطحی ریزنمونه ها، تأثیر هورمون های رشد بر جوانه زنی و ریشه زایی، تأثیر عوامل محیطی،...) و امکان تکثیر چهارگونه از گل زینتی لیلیوم از این طریق بود که یکی از آنها گل در حال انقراض "سوسن چلچراغ" است. امروزه تکنیک های متعددی برای حفظ منابع ژنتیکی گیاهان نادر و در حال انقراض در دسترس می باشد که عبارتند از :

1. Micropropagation
2. Seed Germination
3. Regeneration from Callus
4. Embryo Rescue
5. Micrografting
6. Cryopreservation

(Nitzsche, 1983; Rick, 1984; Stanilova *et al*, 1994, Chang *et al*, 1999)

در این تحقیق سعی در به کارگیری اولین روش (Micropropagation) به طور جامع با هدف دستیابی به روش تکثیر مناسب، به خصوص برای گونه "سوسن چلچراغ" گردید. گرچه سابقه استفاده از این روش تکثیر در خارج از کشور به بیش از چند دهه (Murashige and Skoog, 1962) و در داخل کشور نیز به اوایل دهه پیش باز می گردد (خوشخوی، ۱۳۷۷) ، اما در مؤسسه آموزش عالی علمی (BIHE) برای اولین بار بود



که پس از بیش از ۱۱ ماه تلاش و صرف وقت و هزینه موفق به تهیه لوازم و مواد مورد نیاز گردیده و آزمایشگاه کشت بافت گیاهی راه اندازی شد وسپس طی بیش از ۸ ماه پس از آن با نبود هرگونه تجربه در این زمینه و با تکرار و ممارست و برخورد با مشکلات فراوان از قبیل انواع آلودگی ها و همچنین انواع مشاهداتی که توضیح چندانی برای آنها به نظر نمی رسید، به تدریج با مطالعه منابع و تحقیق از اساتید سایر دانشگاه ها و موسسات داخلی و خارجی، مراحل مختلف تکثیر از طریق کشت بافت پیاده گردید که نتایج حاصل در قسمت قبل ذکر شد. حال در این قسمت به بحث بر روی نتایج حاصل از مراحل مذکور پرداخته می شود.

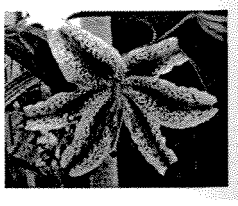
۵,۱. استفاده از فلس های میانی و نیمه پائینی فلس

استفاده از فلس های پیازی، به عنوان اندام مناسب برای تکثیر گل لیلیوم، توسط بسیاری از محققین مورد توجه قرار گرفته است. به طوریکه بسیاری از گزارشات نشان می دهند که فلس های پیازی در مقایسه با سایر قسمت های گیاه واجد بیشترین قابلیت باززایی پیازچه می باشند (Van Aartrijk *et al*, 1990; Wickremesinhe *et al*, 1994; Niimi, 1995). فلس های پیاز لیلیوم حاوی پلی ساکاریدهای ذخیره ای هستند که بیشتر آن را نشاسته و گلوکومانان تشکیل می دهد و تبدیل این پلی ساکاریدهای ذخیره ای به قندهای محلول سبب بهبود پیازدهی و تحریک رشد پیازچه ها می گردد (Yamagishi, 1998; Farasam *et al*, 2003). در تحقیقی که بر روی *L. longiflorum* به همین منظور انجام شد، مشخص گردید که میزان کربوهیدرات کل، در فلس های درونی، میانی و



بیرونی پیاز با یکدیگر متفاوت است (Matsuo, 1979). به علاوه زخم زنی به گیاه و از جمله جدا کردن فلس ها از پیاز مادری خود سبب تحریک تشکیل پیازچه می گردد (Tanimoto and Ishioka, 1992). در واقع زخم زنی فلس ها توسط تقسیم آنها به قطعات مختلف (ریزنمونه) سبب فعال شدن فرآیند سنتز پروتئین های جدید می گردد، به طوریکه آزمایشات نشان داده اند کاربرد Actinomycin-D و Cyclohexamide در محیط کشت ،که دو بازدارنده قوی سنتز پروتئین می باشند، اثر قابل ملاحظه ای در جلوگیری از تمایزیابی پیازچه ها دارد. این حقیقت بر این نکته دلالت دارد که نسخه برداری از mRNA و سنتز پروتئین های جدید برای تمایز پیازچه ها ضروری هستند (Ishioka and Tanimoto, 1993a). در مطالعه ای که بر روی تکثیر گونه *L. speciosum* انجام گرفت، ریزنمونه های فلسی که از قسمت نزدیک به صفحه انتهایی برداشت گردیده بودند در مقایسه با قطعاتی که از قسمت دورتر برداشت گردیده بودند پرآوری و تمایزیابی بیشتری را نشان دادند (Robb, 1957). همچنین در تحقیقی دیگر که بر روی گونه سوسن عید پاک (*L. longiflorum*) انجام گردید ریزنمونه هایی که از بخش های پائینی این گونه به دست آمده بودند در شرایط *In vitro* پیازچه های بزرگتری را نسبت به ریزنمونه های نیمه بالایی تشکیل دادند (Panizze *et al*, 1990). نتایج مشابهی نیز توسط محققین دیگر گزارش گردیده است (Jeong, 1996; Godo *et al*, 1998; Ghazvini *et al*, 2005).

در تحقیق انجام شده نیز سعی شد که از فلس های میانی پیاز ها استفاده شود زیرا فلس های داخلی تر دارای ذخیره کافی نمی باشند و فلس های بیرونی نیز به دلیل سن زیاد



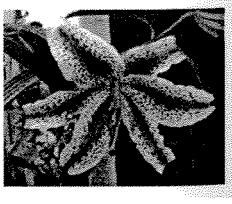
ذخیره خود را مصرف کرده اند. از طرفی در تمام فلس های به کاربرده شده فقط از نیمه پائینی آنها استفاده شد. با این حال همه ریزنمونه های کشت شده از یک گونه نیز با هم سبز نشده و همزمان شروع به تولید پیازچه نمی کردند. به نظر می رسد در نیمه پائینی فلس هم آن قطعاتی که به صفحه تحتانی نزدیک تر بودند زودتر از آنهایی که دورتر بودند پیازچه تولید می نمودند.

این فاصله زمانی در تولید جوانه ، به خصوص در کشت های سوسن چلچراغ بیشتر دیده شد زیرا در این گونه خاص به دلیل مواجهه با کمبود بافت گیاهی مورد نیاز، علاوه بر فلس های میانی از تعدادی از فلس های بیرونی تر و درونی تر هر پیاز هم استفاده گردید و احتمالاً همین مسئله باعث شد که گاهی تا بیش از یک هفته اختلاف زمانی دز جوانه زدن ریزنمونه هایی که همزمان کشت شده بودند دیده شود.

۵,۲.آلودگی

اساساً آلودگی چهار منبع دارد : خود گیاه، محیط کشت، هوا، و عدم دقت محقق (باقری و صفاری، ۱۳۸۳). طی آزمایشاتی که برای کشت بافت چهار گونه مذکور از لیلیوم انجام شد، اولین مرحله ضدعفونی سطحی بافت گیاهی و حذف آلودگی از این طریق بود. از این چهار منبع در واقع همیشه مهمترین آنها که نیاز به تجربه، آزمایش و تأمل بیشتری دارد خود گیاه می باشد زیرا منابع دیگر آلودگی با کمی دقت قابل کنترل و حذف می باشند.

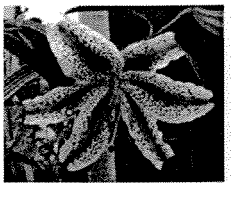
مثلاً برای تهیه محیط کشت در آزمایشات انجام شده کلیه احتیاطات لازمه و مرسوم



در تهیه آن که به طور معمول در آزمایشگاه ها رواج دارند، مراعات گردید (صفحه ۹۳). همچنین در مورد آلودگی هوا، کار در اتاقی که رفت و آمد در آن خیلی کم رخ می داد (در واقع فقط خود آزمایشگر) انجام می گردید. مضافاً استفاده از لامپ UV در درون اتاق و بالاخره کار در محفظه استریل یک هود میکروبیولوژی در هنگام انجام عملیات ضدعفونی سطحی بافت گیاهی، همه اموری بودند که تحت توجه قرار می گرفتند تا آلودگی هوا به عنوان یکی از منابع آلودگی به کلی حذف گردد.

دقت و تجربه محقق نیز عاملی است که در اثر تکرار و تمرین حاصل می گردد. مراحل ضدعفونی (و کلاً کل مراحل کشت بافت گیاهی) ظرایف و حساسیت هایی دارد که نیازمند تمرکز، دقت و سرعت عمل می باشد. در غیر این صورت حتی اگر محقق تمام مراحل ضدعفونی را دقیق انجام دهد و فقط در آخرین مرحله بی دقتی کند، بافت گیاهی استریل شده تماماً آلوده می شود. مشخصاً افزایش تجربه منابع آلودگی را به حداقل می رساند (نمودار ۱-۴).

با این توضیحات واضح است که مهمترین منبع آلودگی در کشت های گیاهی همانا خود بافت گیاهی می باشد. بافت گیاهی که در این آزمایشات استفاده شد فلس های پیازی بود که بدون شک آلوده ترین قسمت گیاه می باشد زیرا درون بزرگترین منبع آلودگی یعنی خاک قرار دارد و به همین دلیل ضد عفونی سطحی آن نسبت به سایر قسمت های گیاه بسیار مشکل تر می باشد (Niimi, 1995). بافت های گیاهی را بسته به اینکه از کدام قسمت از گیاه مادری تهیه شوند، با انواع مختلفی از مواد شیمیایی استریل می نمایند. نوع و غلظت ماده استریل کننده مورد استفاده و مدت زمان تماس آن با نمونه گیاهی، به طور تجربی بایستی



تعیین شود. تعدادی از مرسوم ترین مواد شیمیایی استریل کننده و میزان تأثیر آنها در یک فهرست مقایسه ای در جدول ۱-۵ آورده شده است. متذکر می شود که تیمار بیش از حد با مواد شیمیایی، فقط منجر به حذف کامل میکروارگانیسم نمی گردد بلکه برای بافت گیاهی نیز کشنده است. بنابراین تعیین شرایط بهینه برای هر بافت خاص، اهمیت زیادی دارد.

جدول ۱-۵ : مقایسه میزان تأثیر و ویژگی های استریل کننده های سطحی که به طور معمول برای استریل کردن مواد گیاهی به کار می روند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۵).

Sterilizing agent	Concentration used	Ease of removal	Treatment time (min)	Remarks
Sodium hypochlorite	1 – 1.4 %	+++	5 – 30	Very effective
Calcium hypochlorite	9 - 10 %	+++	5 – 30	Very effective
Hydrogen peroxide	10 - 12 %	+++++	5 – 15	Effective
Bromine water	1 - 2 %	+++	2 – 10	Very effective
Silver nitrate	1 %	+	5 – 30	Effective
Mercuric chloride	0.01 – 1 %	+	2 – 10	Satisfactory
Antibiotics	4 – 50 mg/L	++	30 – 60	*Effective*

گرچه در تحقیق انجام شده امکان آزمایش و استفاده از تمام استریل کننده های ذکر شده در جدول ۱-۵ وجود داشت ولی مطالعه و بررسی تحقیقات و پژوهش های انجام



شده نشان دادند که متداولترین و مؤثرترین ماده برای ضدعفونی سطحی، هیپو کلریت سدیم می باشد. به عنوان مثال در تحقیقی برای بررسی بوجود آمدن رکود در پیازهای گونه *L. speciosum*، که از طریق کشت بافت تکثیر شده بودند، فلس ها در محلول ۱ ٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس ریزنمونه ها تهیه و کشت شدند؛ هیچ کشت آلوده ای مشاهده نشد (Aguettaz *et al*, 1990). البته به استفاده از اتانول (۷۰ یا ۹۶ درصد) نیز در بعضی منابع اشاره شده است. به عنوان مثال در تحقیقی که هدف آن بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر روی میزان باززایی ریزنمونه های گونه *L. ledebourii* (Boiss) Baker در محیط کشت بود، فلس ها ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۶ ٪ قرار گرفته و متعاقباً به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۲/۵ ٪ هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند. سپس سه بار با آب مقطر استریل آب کشی شده و در قطعات ۷×۷ میلی متر برش گیری شدند(Ghazvini *et al*, 2005). تعدادی از محققین از قارچکش ها (بنومیل، دینوکاپ، کاپتان) نیز در مراحل اولیه ضد عفونی استفاده کرده اند. به عنوان مثال در تحقیقی ابتدا فلس های پیاز *L. speciosum* در درون محلولی از دو قارچکش تجاری Benlate (که حاوی ۵۰ ٪ از ماده مؤثره بنومیل می باشد) و Difolatan (که حاوی ۴۸ ٪ ماده مؤثره کاپتان می باشد) تیمار شدند. آنگاه به مدت دو ساعت زیر آب روان شستشو داده شده به مدت چند ثانیه نیز در درون اتانول ۷۰ ٪ قرار گرفتند. متعاقباً فلس ها به مدت ۱۵ دقیقه درون محلول هیپوکلریت ۱ ٪ منتقل شده و در انتها نیزسه بار با آب مقطر استریل آب کشی گردیدند. پس از این اقدامات عملیات برش گیری برای تیه ریزنمونه ها در فضای استریل انجام شد (van Aartrijk J & Blom-Barnhoorn G.J, 1981). در



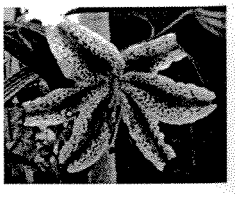
بسیاری از تحقیقات دیگر که در زمینه کشت *In vitro* فلس های پیاز انواع لیلیوم انجام شده تقریباً روشی مشابه با کمی تغییرات به کار گرفته شده است. (Simmonds JA & Cumming BG, 1976; Jeong J.H, 1996; Chang *et al*, 2000; Kumar *et al*, 2005; Khosh-khui &Azadi, 2007).

مشخصاً روش کلی که در این تحقیق برای استریل کردن ریزنمونه ها به کار گرفته شد، کاملاً با روش های مورد استفاده در پژوهش های گذشته مطابقت داشت و نتایج به دست آمده نشان دادند که نوع مواد مورد استفاده نیز مناسب بودند. تغییرات کوچکی که در طی هر مرحله از کشت انجام شد جهت بهینه سازی روش به کار گرفته شده بود و کاهش چشمگیر میزان آلودگی را سبب گردید به طوریکه میزان آلودگی که در کشت گونه اول بیش از ۹۰ ٪ بود به کمتر از ۱۰ ٪ در کشت گونه سوم رسید و در کشت گونه چهارم (سوسن چلچراغ) دیگر نشانه ای از آلودگی سطحی ملاحظه نشد. تنها آلودگی مشاهده شده در کشت های سوسن چلچراغ که در بخش قبلی مشخصات ظاهری آن شرح داده شد، نوعی آلودگی باکتریایی بود که پس از بررسی آزمایشگاهی مشخص شد که باکتری از جنس *Klebsiella* می باشد.

همانطور که در قسمت "روش ها" نیز ذکر گردید، ریزنمونه ها (مربوط به هر چهار گونه) ابتدا در محیط کنترل کشت می شدند و متعاقباً پس از ۷ تا ۱۴ روز به محیط کشت حاوی غلظت هورمونی مورد نظر منتقل می شدند. دلایل اصلی این کار این بود که اولاً با این کار فقط ریزنمونه هایی به غلظت مورد نظر منتقل می شدند که رنگ سبزی به خود می گرفتند که این به منزله قدرت سبز شدن و باززایی است. دیگر ریزنمونه ها تا زمانی که رنگ



سبزی از خود نشان نمی دادند در محیط کنترل باقی می ماندند (نهایتاً دو هفته دیگر) و آن دسته از ریزنمونه ها نیز که قهوه ای رنگ می شدند طبعاً از بین رفته تلقی شده و حذف می گردیدند. ثانیاً اگر پس از ضد عفونی سطحی، آلودگی در سطح بعضی از ریزنمونه ها باقی مانده بود در طی این فاصله زمانی رشد می کرد و در نتیجه لوله های آلوده، مشخص شده جدا می شدند، و هیچ ریزنمونه آلوده ای در غلظت های هورمونی کشت نمی شد. از روی همین مطلب می توان نتیجه گرفت که آلودگی در محیط های کشت سوسن چلچراغ سطحی نبوده است زیرا ریزنمونه های این گیاه هنگام انتقال به غلظت های مورد نظر خود (تقریباً ۷ روز پس از کشت در محیط کنترل) هیچ آلودگی سطحی (که حداقل با چشم قابل رویت باشد) نداشتند. ولی حدود یک هفته پس از انتقال به محیط های هورمون دار، هاله کدر رنگ مشخصه این باکتری در زیر ریزنمونه تعدادی از لوله ها مشاهده می شد و در هفته های بعد به تدریج سایر ریزنمونه ها نیز این هاله کدر رنگ را نشان می دادند. به علاوه غلظت محلول هیپوکلریت به کارگرفته شده برای ضد عفونی سطحی ریزنمونه های چلچراغ دو برابر آنچه که برای سه گونه قبلی به کار گرفته می شد بود، در حالیکه ریزنمونه های هیچ یک از سه گونه قبلی چنین آلودگی باکتریایی که پس از انتقال رشد کند، نشان ندادند. این شواهد دلالت بر این دارد که این آلودگی در سطح فلس نبوده و از درون بافت آن منشأ می گیرد [در واقع این نوع باکتری ها را "endophytic" می نامند (Adachi *et al*, 2002)]. برش زدن بافت گیاهی در هنگام تهیه ریزنمونه باعث می شود که این نوع باکتری ها در محل برش در مجاورت محیط کشت قرار گیرند و گرچه ممکن است محیط کشت گیاهی محیط مناسبی برای رشد سریع باکتری نباشد ولی وجود منبع کربن و نیتروژن و



تعدادی از سایر عناصر دیگر شرایط کافی برای رشد باکتری را فراهم می آورد (باقری و صفاری، ۱۳۸۳).

باکتری داخلی که در این تحقیق در کشت های سوسن چلچراغ ملاحظه شد کلبسیلا است. مشخصه اصلی این باکتری توانایی تثبیت نیتروژن (diazotrophic) است. به طور کلی فقط پروکاریوت ها هستند که این توانایی را دارند و از این نظر نیز به دو گروه تقسیم می شوند:

۱. تثبیت کننده هایی که زندگی آزاد[1] دارند که خود شامل:

- بی هوازی های اجباری مانند *Clostridium pasteurianum*
- بی هوازی های اختیاری مانند *Klebsiella* که قرابت نزدیکی با *E. coli* دارد
- باکتری های فتوسنتز کننده مانند *Rhodobacter*
- گونه های بسیاری از cyanobacteria
- هوازی های اجباری مانند *Azotobacter*
- تعدادی از باکتری های متان زا (methanogens)

۲. تثبیت کننده های همزیست[2] با گیاهان که مهمترین آنها شامل دو جنس زیر می باشد:

[1] Free living
[2] Symbiotic



- *Rhizobium* و *Bradyrhizobium*. این دو جنس در بافت گره هایی که در ریشه گیاهانی مانند لوبیا، نخود، یونجه، شبدر،... دیده می شوند، به صورت هم زیست زندگی می کنند.

باکتری های هر دو گروه نیتروژن را توسط آنزیمی به نام "nitrogenase" تثبیت می نمایند؛ این آنزیم در حضور اکسیژن غیر فعال می شود و به همین دلیل کلیه باکتری های هر دو گروه فقط در شرایط بی هوازی قادر به تثبیت نیتروژن می باشند. در مورد تثبیت کننده های همزیست این مشکل مرتفع شده است زیرآنها در شرایط بی هوازی داخل بافت زندگی می کنند. در زندگی همزیستی هر دو طرف سود می برند و صدمه ای در کار نیست، گیاه اسیدهای آلی مانند succinate, fumarate, malate در اختیار باکتری قرار می دهد و باکتری هم نیتروژن تثبیت شده، نه به شکل آمونیاک که سمی است، بلکه به صورت اسیدهای آمینه برای سلول های گیاهی فراهم می کند.

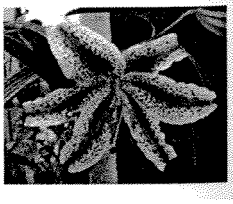
در مورد تثبیت کننده های گروه اول (به غیر از بی هوازی های اجباری) آنها فقط وقتی که شرایط بی هوازی فراهم شود (معمولاً هنگامی که گیاهی را آلوده کرده باشند) قادر به تثبیت نیتروژن می باشند (White, 2007). باکتری های گروه اول معمولاً گونه هایی مهاجم و بیماری زا می باشند ولی برخی از تحقیقات نشان داده اند که تعدادی نیز گیاهان را آلوده کرده بی آنکه بیماری در آنها ایجاد نمایند (Hurek *et al*, 1994; James *et al*, 1994; Assmus *et al*, 1995; James *et al*, 1997; Jame and Olivares, 1998). مثلاً در مورد باکتری *Gluconacetobacter diazotrophicus* مشاهده شد که پس از آلوده کردن نیشکر، باکتری به سرعت شروع به



سنتز آنزیم nitrogenage نمود و به صورت همزیست به تثبیت نیتروژن برای گیاه پرداخت (Cavalcante and Dobereiner, 1988; Sevilla *et al*, 1998). ولی این پدیده در مورد همه گونه های گروه اول صادق نیست. متذکر می شود که اکثر باکتری های این گروه (من جمله کلبسیلا) وقتی وارد بافت گیاهی می شوند باعث تشکیل گره نمی گردند. محققین متعددی نشان داده اند که در مورد نیشکر، محل تجمع و کلنیزه شدن[1] این باکتری ها فضای بین سلولی[2] بافت آپوپلاست ها (apoplasts) می باشد (Dong et al, 1994; 1995; Dobereiner et al, 1995; Jame and Olivares, 1997; McCully, 2001). در تحقیقی دیگر Chelius and Triplett (2000) مشاهده کردند که تعداد زیادی کلنی های *Klebsiella pneumoniae* در فضای داخل سلولی[3] و بین سلولی تارهای کشنده ریشه های گیاه ذرت وجود دارد؛ اگرچه این باکتری در قشر ساقه هم یافت شد ولی تعداد آن در آنجا بسیار کم و به صورت منفرد بود. آنها دریافتند که این باکتری هنگامی که در مجاورت یک منبع کربن مانند ترشحات خود گیاه و یا کربن آلی موجود در خاک، قرار می گیرد به سرعت شروع به سنتز آنزیم nitrogenase نموده، متعاقباً به تثبیت نیتروژن می پردازد. به علاوه در نبود این منبع، تثبیت نیتروژن هنگامی که گیاه هنوز در مراحل اولیه رشد خود بود (دانهال[4]) متوقف شد.

محققان *Klebsiella* را از بافت گیاهان مختلف به دست آورده اند: Paula *et al*(1993); Dobereiner *et al* (1995) از سیب زمینی شیرین[5] در برزیل، McIrony and Kloepper (1995) Yoo *et al* (1986) از rhizosphere برنج،

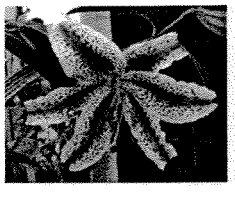
[1] Colonizing
[2] Intercellular spaces
[3] Intracellular
[4] Seedling
[5] Sweet potato



از ساقه ها و ریشه های استریل شده ذرت شیرین[1] و پنبه، و بالاخره Palus *et al*, (1996) از ساقه های *Zea mays* و *Z. luxurians*. گاهی حضور یا نبودن باکتری در بافت ها به فصلی از سال که نمونه گیری انجام می شود (در واقع وضعیت رشدی گیاه) بستگی دارد. به عنوان مثال در تحقیقی که Adachi *et al*, (2002) بر روی سیب زمینی شیرین انجام دادند مشاهده کردند که باکتری *Klebsiella oxytoca* را می توان از نمونه هایی که در ماه سپتامبر تهیه شده اند جدا کرد ولی در نمونه های جولای و آگوست اثری از این باکتری نیست.

در تحقیق حاضر کلبسیلا در بافت فلس های پیاز سوسن چلچراغ شناسایی شد و این احتمال نیز هست که این باکتری در سایر بافت های این گیاه نیز وجود داشته باشد. از آنجائیکه پایه های گیاهی که از منطقه داماش تهیه شدند و همچنین پیازهای آنها علامت خاصی از زردی و یا پوسیدگی نداشتند احتمالاً این باکتری به نحوی در بافت های سوسن چلچراغ وارد شده است و هرچند رابطه دو جانبه گیاه و باکتری نیاز به بررسی های بسیار موشکافانه و حضور مستمر در محیط طبیعی و بررسی خصوصیات رشدی و فیزیولوژیک گیاه دارد، به نظر می رسد نباید آن را به عنوان یک عامل مهاجم که باعث بیماری می شود دانست. به علاوه همانطور که در مورد تعدادی از گیاهان دیگر ذکر گردید، کلبسیلا وقتی در شرایط بی هوازی داخل بافت های گیاهی قرار می گیرد به تثبیت نیتروژن می پردازد که محصولات این فرآیند، بدون شک برای گیاه میزبان مفید می باشد. شاید چنین رابطه ای بین سوسن چلچراغ و گونه کلبسیلایی که در بافت های آن زندگی می کند برقرار باشد.

[1] Sweet corn



ریزنمونه های چلچراغ در هفته های اول کشت حتی با وجود این باکتری در محیط، به خوبی پیازچه تولید نموده که با سرعت مناسبی نیز رشد کردند. اما پس از چند هفته که باکتری در محیط به تعداد زیاد تکثیر شد و هاله باکتریایی اطراف ریزنمونه وسیع گشت، به تدریج ریزنمونه و قسمت پائین پیازچه های روی آن و همچنین ریشه های آنها که در تماس با محیط و باکتری بودند شروع به زرد شدن کرده و بافت آنها از بین رفت. با این توضیحات می توان گفت که این احتمال وجود دارد که این خود باکتری نباشد که مستقیماً به بافت ریزنمونه حمله می کند بلکه با گذشت زمان که باکتری تکثیر می شود، مواد غذایی موجود در محیط و به خصوص در اطراف ریزنمونه را مصرف نموده (زیرا بیشتر تمرکز و تکثیر باکتری در اطراف ریزنمونه بود و به میزان کمی در محیط انتشار پیدا می کرد) نتیجتاً در اثر تجمع مواد دفعی و ضایعاتی که از متابولیسم باکتری ها در مجاورت گیاه حاصل شده که قائدتاً برای سلول های گیاهی سمی می باشد، بخش های گیاهی مجاور این مواد، شروع به زرد شدن کرده که نهایتاً کل ریزنمونه از بین می رود.

در این تحقیق برای اولین بار وجود باکتری درونی کلبسیلا در فلس های پیاز سوسن چلچراغ گزارش می گردد. سؤال مهمی که پیش می آید این است که آیا این باکتری تأثیری در سرعت رشد و وضعیت فیزیولوژیک این گل دارد یا خیر که اگر داشته باشد شاید کلید مسئله ضعف این گل در حال انقراض باشد که با وجود مراقبت های شدید، هر سال از تعداد پایه های محدود آن کمتر هم می شود. آنچه در مورد تأثیرات احتمالی این باکتری بر روی ریزنمونه و پیازچه های حاصل از آن در محیط کشت ذکر گردید، فقط در حد نظرات پیشنهادی بود و پیدا کردن گونه دقیق کلبسیلا و تعامل های احتمالی این باکتری



با این گیاه، نیاز به بررسی های دقیق باکتریولوژیکی، هیستولوژیکی، و مولکولی دارد.

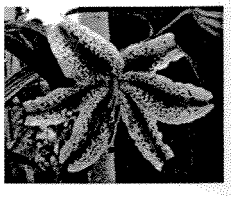
۵,۳. قهوه ای شدن

همانطور که در نتایج ذکر گردید، میزان قهوه ای شدن ریزنمونه ها یک سیر کاملاً صعودی را از لیلیوم گونه اول تا سوم طی نمود. برای توضیح این مشاهده ، لازم است که به طور مختصر در مکانیزم قهوه ای شدن و مردن بافت ریزنمونه ها، و عوامل محرک و همچنین بازدارنده آن بحث شود.

به طور کلی فرآیند قهوه ای شدن در گیاهان به وسیله آنزیم polyphenyl oxidize صورت می گیرد. این آنزیم در پلاست های سلول های گیاهی قرار دارد در حالیکه سوبسترای[1] فنولی این آنزیم در واکوئول های سلول های گیاهی ذخیره می شود. جدا بودن این قسمت ها از یکدیگر از واکنش قهوه ای شدن جلوگیری می نماید، مگر اینکه سلول های گیاهی آسیب ببینند و در اثر پارگی پلاست ها و واکوئول ها، این آنزیم و سوبسترای آن با هم مخلوط شوند. هنگام بروز چنین حالتی رشد متوقف و بافت گیاهی از بین می رود (احسان پور و امینی، ۱۳۸۲).

از آنچه ذکر گردید مشخص می باشد که مهمترین عامل قهوه ای شدن بافت ریزنمونه ها صدمه دیدن بافت می باشد. به علاوه رقیق بودن بیش از حد محیط کشت در محیط های جامد، قدیمی بودن محیط، کهنگی و فاسد بودن آگار مورد استفاده، اتوکلاو نمودن نادرست محیط کشت، و بالاخره به شدت قلیایی یا اسیدی بودن محیط کشت از

[1] Substrate



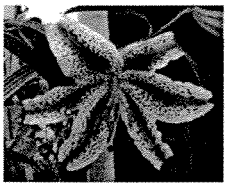
عوامل افزایش دهنده قهوه ای شدن در محیط کشت می باشند (Kyte and Kleyn, 2003).

برای کاهش قهوه ای شدن و جلوگیری از اثرات نامطلوب آن معمولاً از روش های زیر استفاده می نمایند:

- افرودن زغال فعال به محیط کشت
- افزودن پلی وینیل پیرولیدون (PVP) به محیط کشت
- افزودن مواد آنتی اکسیدان به محیط کشت که معمول ترین آنها اسید سیتریک و اسید اسکوربیک می باشند.
- افزودن اسیدهای آمینه گلوتامین، آرژینین، آسپاراژین به محیط کشت
- افزایش تعداد دفعات واکشت و کاهش فاصله بین واکشت ها
- استفاده از محیط کشت مایع، که سریعتر ترکیبات فنولی و تولیدات سمی را رقیق می کند.
- شستشوی نمونه با آب مقطر و خیساندن آن در آب مقطر
- نگهداری نمونه گیاهی در تاریکی
- جلوگیری از زخمی شدن بافت
- استفاده از تنظیم کننده های رشد در محیط کشت مثل اکسین های 2,4-D و IAA که سنتز مواد فنولی را به تأخیر می اندازند.

(باقری، زیارت نیا، حسینی، ۱۳۸۳).

در تمام گونه های کشت شده گرچه از هیچ یک از مواد شیمیایی یا آلی معرفی شده

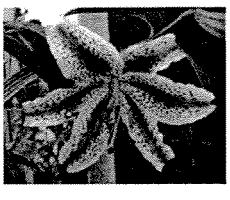


فوق برای جلوگیری از قهوه ای شدن بافت ها استفاده نشد (افزودن این مواد به محیط کشت در کنار جذب مواد فنولیک، معمولاً تأثیرات منفی و جانبی بر روی سایر ترکیبات محیط کشت و خود ریزنمونه نیز دارد مثلاً زغال فعال به شدت جاذب ترکیبات آلی موجود در محیط کشت به خصوص هورمون های رشد می باشد) (باقری، زیارت نیا، حسینی۱۳۸۳). ولی سعی شد تمام عواملی که منجر به بروز واکنش قهوه ای شدن می شوند حذف شوند. استفاده از ۶ میلی گرم در لیتر آگار که محیط های کشت را به میزان مناسب جامد می کرد ، کاربرد محیط های تازه که حداکثر یک هفته از تهیه آنها گذشته بود، اتوکلاو نمودن محیط در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۵ درجه سانتی گراد و تنظیم دقیق pH محیط در بازه ۵/۷ تا ۵/۸، همه کارهایی بودند که در مقابله با عوامل فوق انجام شدند. به علاوه ریزنمونه ها مرتباً به فاصله زمانی چهار هفته واکشت می گردیدند؛ همیشه از فلس های سالم استفاده می شد و برای جلوگیری از صدمه دیدن بافت ها، فلس ها به آرامی از پیاز جدا می شدند و حتی در مراحل ضدعفونی، از دستگاه همزن نیز استفاده نمی شد تا در اثر تکان های زیاد دستگاه، بافت ها صدمه نبینند و تمام مراحل هم زدن، با حرکات آرام دست انجام می شد.

تأثیر هورمون های رشد را در محیط های کشت دو گونه اول و همچنین گونه سوسن چلچراغ را نیز نباید نادیده گرفت زیرا اکثر این ترکیبات، سنتز مواد فنولی را به تأخیر می اندازند. به احتمال زیاد نبود این هورمون ها در محیط کشت گونه سوم از جمله یکی از عوامل دخیل در فرایند قهوه ای شدن و از بین رفتن ریزنمونه های آن می باشد. مضافاً از سطوح برش خورده ریزنمونه ها مواد فنولیک به داخل محیط کشت رها می شوند که این البته یک مکانیسم دفاعی طبیعی گیاه در مقابله با عوامل بیماریزا و زخم ها محسوب می شود



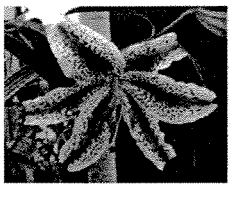
ولی باعث صدمه دیدن و نهایتاً از بین رفتن خود بافت ریزنمونه نیز می گردد (Hu and Wang, 1983; Precee and Compton, 1991; Baydar, 2006). با این حال تعداد ریزنمونه های قهوه ای شده در کشت گونه سوم (علی رغم اینکه پس از کشت دو گونه قبلی سعی شد در این یکی، تمام موارد بالا کاملاً رعایت شود) بیشتر از دو کشت قبلی بود. از طرفی دیگر در کشت گونه چهارم (سوسن چلچراغ) که عیناً تمام موارد رعایت شده در گونه سوم در این مورد هم مراعات گردید، تقریباً در هیچ غلظت هورمونی ریزنمونه قهوه ای شده دیده نشد. از این ملاحظات می توان نتیجه گرفت که قهوه ای شدن تابع عوامل مهم دیگری چون نوع گیاه و ژنوتیپ گونه کشت شده، سن گیاهی که از آن بافت گیاهی تهیه شده است، شرایط فیزیولوژیک گیاه در زمان نمونه برداری و حتی نوع بافت و سایز ریزنمونه نیز می باشد (Yu and Meredith, 1986; Thomas and Ravindra, 1997; Tangolar *et al*, 1999; Roussos and Pontokis, 2001). تحقیقات متعدد نشان داده است که عموماً در کشت گیاهان چوبی واکنش قهوه ای شدن بیشتر از گیاهان علفی دیده می شود و در بین گیاهان چوبی نیز به عنوان مثال ریزنمونه های موز و خرما بسیار بیشتر از ریزنمونه های سیب و گیلاس دچار این عارضه می شوند (احسان پور و امینی، ۱۳۸۲). به علاوه محققین نشان داده اند که میزان مواد فنولیکی که از ریزنمونه ها رها می شود بسته به اینکه در چه زمانی از سال نمونه گیری انجام شده باشد متفاوت است؛ در نتیجه می توان با انتخاب فصل مناسب میزان آزاد شدن مواد فنولیک را به کمترین حد خود رساند (Dalal *et al*, 1993; Thomas and Ravindra, 1997; Dhar and Upreti, 1999). در مورد سه گونه اول لیلیوم مورد آزمایش، گرچه هر سه در یک زمان،



از یک گلخانه و در یک فصل از سال خریداری شدند ولی پیازهای گونه اول تازه جوانه زده بودند، پیازهای گونه دوم ساقه های کوتاهی در حدود ۵ سانتی متر داشتند و پیازهای گونه سوم دارای ساقه هایی در حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتی متر بودند. این تفاوت در رشد ساقه ها بدین معنی است که پیازها در هنگام تهیه ریزنمونه، از نظر سنی و شرایط فیزیولوژیک درونی در سه حالت متفاوت بودند (اولی کاملاً جوان ولی سومی دارای ساقه نسبتاً بلند که چند غنچه هم داشت). معمولاً هرچه بافت جوان تر باشد کمتر دچار عارضه قهوه ای شدن می شود زیرا در بافت های مسن تر ترکیباتی مانند tannins و hydroxyphenols تجمع می یابند که در میزان قهوه ای شدن تأثیر افزاینده دارند (Benson et al, 1992; Harding et al, 1994; Baydar, 2006). در مورد سوسن چلچراغ هم نمونه گیری در فصل بهار (اوایل خرداد) یعنی فصل گلدهی این گیاه انجام شد ولی نمونه گیری از پیازی انجام شد که به نظر غیر فعال بوده و عاری از سایر قسمت های تشکیل دهنده گیاه (ساقه، برگ، و یا گل) بود و تازه شروع به تولید مریستم ساقه کرده بود یعنی یک پیاز کاملاً جوان. در نهایت به نظر می آید در اختلافی که در تعداد ریزنمونه های قهوه ای شده در بین این چهار گونه دیده شد احتمالاً عوامل دیگری چون تفاوت های گونه ای و ژنوتیپی، تفاوت در اندازه ریزنمونه ها و اینکه هر ریزنمونه از کجای پیاز تهیه شده نیز دخالت داشته اند.

۵,۴. تأثیر هورمون های رشد

هدف از کشت بافت کنترل شرایطی است که ریزنمونه در آن رشد یافته و این رشد در جهت اهداف مورد علاقه باشد. رشد هر بافت یا اندام چه در کشت درون شیشه ای و چه



به عنوان بخشی از یک گیاه کامل، نهایتاً توسط شرایط فیزیولوژیکی داخل بافت ها تعیین می شود. گیاه با تغییر شرایط فیزیولوژیک، به تغییرات شرایط رشد پاسخ می دهد و به دنبال آن نتیجه نهایی، تأثیر متقابل شرایط خارجی و شرایط فیزیولوژیکی فعلی داخل بافت می باشد؛ به عبارت دیگر الگوی رشد برآیند تأثیرات شرایط فیزیولوژیک داخلی و خارجی حاکم بر گیاه است. این مسئله به خصوص در کشت بافت اهمیت فراوانی می یابد زیرا به طور طبیعی وضعیت فیزیولوژیک گیاه بر حسب مراحل مختلف رشد گیاه، تغییر شرایط محیطی و تغییر فصل متفاوت است. در کشت بافت، کنترل این وضعیت یا از طریق کنترل محیط مانند درجه حرارت، نور، تأمین آب و تأمین مواد غذایی انجام می پذیرد و یا اینکه مستقیماً از طریق استفاده از هورمون های رشد گیاهی صورت می گیرد (معینی و کهریزی، ۱۳۸۲).

در تحقیق حاضر ضمن کنترل دقیق عواملی مثل نور، درجه حرارت و رطوبت، بیشتر به بررسی تأثیر هورمون های رشد (سایتوکینین: BA، اکسین: NAA و IBA) بر روی میزان جوانه زنی، ریشه زایی، کالوس زایی و سرعت رشد آنها پرداخته شد. به طور کلی در گیاه، اکسین در انتهای ساقه ساخته شده و حرکت آن به سمت پایین منجر به جلوگیری از رشد جوانه های جانبی می شود. در کشت بافت نیز اکسین ها معمولاً آغاز ریشه دهی و رشد کالوس را تحریک کرده باعث طویل شدن سلول ها می شوند امّا مانع جوانه زنی می گردند. از طرفی سیتوکینین ها در گیاه در سلول های فعال انتهای ریشه ساخته می شوند و با حرکت خود به سمت بالا، باعث تحریک رشد بافت های مریستمی ساقه می گردند. در کشت بافت هم این هورمون ها تقسیم سلولی و جوانه زنی را تحریک کرده ولی



از آغازش ریشه جلوگیری می کنند (لاهوتی، حسن آبادی، احمدیان، ۱۳۸۲).

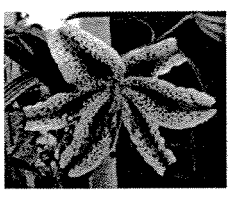
۵،۴،۱. مقایسه سه گونه "Acapulco"، "Cebeco Dazzle"، و "Tresor"

در پژوهش انجام شده نتایج به دست آمده، اثر کاملاً معنی دار و مشهود هورمون های رشد را بر میزان باززایی ریزنمونه ها ثابت می نماید. مثلاً با بررسی نمودارهای ۲-۴ و ۳-۴ به سهولت می توان دریافت که اضافه کردن ۰/۱ میلی گرم در لیتر از هر یک از هورمون های BA و NAA به محیط کشت دو گونه "Acapulco" و "Ceb Dazzle" میزان جوانه زنی ریزنمونه های این دو گونه را تقریباً چهار برابر گونه سوم ("Tresor") که به محیط کشت آن هورمونی اضافه نشده بود کرده است. باززایی تعداد کم جوانه در محیط فاقد هورمون حاکی از آن است که هورمون های رشد درونی در ریزنمونه های فلس هر یک از این سه گونه وجود دارند (تعدادی تیمار کنترل برای گونه های اول و دوم هم کشت شد و در آنها نیز تعداد کمی جوانه رشد کردند) ولی احتمالاً میزان آنها کافی نمی باشد یا اینکه دارای تعادل لازم برای تولید تعداد بهینه جوانه نیستند. در حالیکه اضافه کردن میزان مشخصی از ترکیب هورمون های خارجی به محیط، ریزنمونه ها را به آن نقطه تعادل داخلی که باعث بروز بیشترین قدرت باززایی آنها می شود نزدیک می کند. مشاهدات حاصل از این تحقیق کاملاً با نتایج سایر محققین مطابق است. Takayama and Misawa (1982) گزارش کردند که تشکیل پیازچه های برگدار در *L. auraltwn* از ریزنمونه های فلسی، در محیط MS که حاوی هورمون های سایتوکینین باشد انجام می شود. همچنین در بررسی دیگری که Bong Hee Hun *et al* (2004) بر روی

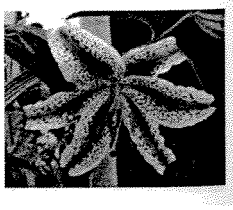


"Casablanca" *L.* انجام دادند ریزنمونه های فلسی که بر روی محیط MS حاوی ۲/۲ میکرو مول BA کشت شدند بیشترین میزان پیازچه را تولید نمودند. آنها سپس نشان دادند که بیشترین میزان جوانه زایی از کشت فلس هایی که از همین پیازچه ها به دست آمده اند بر روی محیط MS که حاوی ۴/۴ میکرو مول از سایتوکینین BA و ۵/۷ میکرو مول از اکسین IAA بود حاصل می شود. در تحقیقاتی که توسط دو دانشمند ژاپنی انجام گردید، مشخص شد که در تیمار شاهد که فاقد تنظیم کننده های رشد بود، میزان پروتئین اندازه گیری شده در وزن تر هر ریزنمونه کمتر از محیط دارای تنظیم کننده های رشد NAA یا BA یا ترکیبی از آنها بود. در این محیط ها میزان پروتئین در اوایل دوره کشت به شدت افزایش یافته و سپس به تدریج تا دهمین روز کاهش یافت. تغییرات کمّی پروتئین هایی که جدیداً در مراحل اولیه تمایز، سنتز شده بودند بر روی ژل پلی آکریل آمید، پنج باند با وزن مولکولی ۱۷، ۳۲، ۶۰، ۶۲، و ۸۰ کیلو دالتون (KD) را در قطعات فلس نشان دادند. مطالعات بعدی مشخص کرد که پلی پپتیدهای با وزن مولکولی کم، برای تمایز اندام های نابجا در گیاهان عالی ضروری هستند (Ishioka and Tanimoto, 1993b).

از آنجائیکه سایتوکینین ها هورمون های محرک جوانه زایی می باشند، ریزنمونه های گونه "Ceb Dazzle" پس از چهار هفته به محیطی که غلظت سایتوکینین آن پنج برابر محیط قبلی بود انتقال داده شدند (۰/۱ میلی گرم NAA و ۰/۵ میلی گرم BA). آنچه از این افزایش انتظار می رفت ازدیاد تعداد جوانه های حاصل بود که همین نتیجه هم حاصل شد ولی در واقع به طور غیر مستقیم. یعنی به جای اینکه جوانه های بیشتر مستقیماً بر روی ریزنمونه ها تشکیل شوند، این افزایش غلظت سایتوکینین باعث شد که ابتدا مقادیر زیادی



توده های کالوس بر روی ریزنمونه ها ظاهر شوند و متعاقباً از این کالوس ها تعداد زیادی جوانه (بیش از دو برابر آنچه که مستقیماً از ریزنمونه ها به دست آمده بودند) تشکیل گردند (نمودار ۳-۴). این مشاهده نشان داد که افزایش میزان پرآوری و ریزازدیادی از طریق روش غیر مستقیم (بخش دوم ص ۴۲) دارای نتایج بسیار چشمگیرتری می باشد. لازم به ذکر است که اشکال غیر طبیعی جوانه و گیاهچه های حاصل از آنها نیز در این روش بیشتر دیده شدند (بخش "نتایج" ص ۱۷). به طور کلی تحقیقات متعدد نشان داده که افزایش میزان هورمون های رشد در محیط کشت به خصوص غلظت های بالای آنها باعث تولید توده های کالوس از ریزنمونه ها بدون توجه به نوع بافت کشت شده می شود. در تحقیقی که Lim *et al.* (1998) بر روی *L.* Casablanca انجام دادند، غلظت بالای BA ضمن منع تشکیل پیازچه بر روی ریزنمونه های فلسی این گونه، باعث تشکیل مقادیر زیادی کالوس و جوانه های غیر طبیعی شد. Hussey (1976, 1977) نیز چنین نتایجی را از ریزنمونه های فلسی *L. longiflorum* و *L. pyrenacium* با افزودن ۲ تا ۸ میلی گرم در لیتر BA به محیط کشت MS به دست آورد. البته غلظت BA موجود در محیط کشت تحقیق جاری کمتر از این مقادیر (۰/۵ میلی گرم در لیتر) بود لکن به نظر می رسد با حضور اکسین NAA در محیط، یک ترکیب مناسب برای کالوس زایی حاصل شده است. در بررسی دیگری (هرچند کاملاً مشابه تجربه حاضر نمی باشد) به منظور تکثیر *L. speciosum* Thunb بافت غنچه به ریزنمونه های ۲ میلیمتری برش داده شده و بر روی محیط پایه MS که حاوی ۳ میلی گرم در لیتر 2,4-D (یک اکسین مصنوعی) و ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA بود قرار داده شد. پس از سه ماه ابتدا بافت پینه و سپس پیازچه ها تشکیل شدند. آنگاه این پیازچه ها



را به جهت رشد کالوس و تولید گیاهچه به یک محیط پایه MS جدید که حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بود انتقال داده شدند (Chang *et al*, 2000).

در مرحله بعد، پیازچه های حاصل از هر سه گونه به محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BA منتقل گردیدند. از آنجائیکه اکسین ها هورمون هایی ریشه زا بوده و باعث رشد طولی سلول ها می شوند، انتظار می رفت که پس از چند هفته این پیازچه ها چندین ریشه با طول مناسبی تولید نمایند ولی نتیجه کاملاً معکوس بود (جدول ۴-۴). دلیل را باید بدون شک در اثر مهاری هورمون سایتوکینین (BA) موجود در محیط دانست زیرا معمولاً ریشه زایی در محیطی که حتی حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر از یک اکسین مصنوعی قوی (مانند NAA یا IBA) باشد به خوبی انجام می شود. بررسی های Dabrwoski *et al* (1992) بر روی پیازچه های حاصل از ریزنمونه های فلسی *L.* cv Sonnentiger نشان دادند که حضور BA و دو سایتوکینین دیگر (2iP، kinetin) در کنار NAA به کلی مانع تشکیل ریشه در محیط MS گشت؛ اگرچه در تحقیقی دیگر که بر روی *L. japonicum* Thunb انجام شد مشخص گردید که پیازچه های تشکیل شده بر روی کالوس های حاصل از ریزنمونه های فلسی این گونه، به خوبی در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر BA ریشه دار شدند (Mizuguchi and Ohkawa, 1994). به هر حال در تحقیق حاضر، هورمون BA گرچه به وضوح اثر مهاری خود را اعمال نموده ولی در پیازچه های هیچ یک از سه گونه به کلی مانع از ریشه زایی نشده است (جدول ۴-۴). در کل به نظر می آید ژنوتیپ، گونه لیلیوم مورد آزمایش، و احتمالاً برخی از فاکتورهای محیطی از عوامل مهمی باشند که در میزان



ریشه زایی دخالت دارند (Novak and Petru, 1981). مشخصه دیگری که این ترکیب هورمونی باعث بروز آن شد، تشکیل توده های کالوس بود که همانطور که بالاتر نیز به آن اشاره شد به سهولت می توان نتیجه گرفت غلظت بالای اکسین به کار گرفته شده محرک تشکیل این توده ها بوده است (Niimi, 1984a; Nhut, 1998).

نتایج حاصل از انتقال نیمی از گیاهچه های هر یک از سه گونه، به محیط های حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر اکسین قوی IBA و نیمی دیگر به محیط های حاوی ۱ میلی گرم در لیتر همین هورمون نشان دادند با آنکه هر دو غلظت این هورمون به خوبی ریشه زایی و رشد طولی ریشه های جدید را تحریک کردند، لکن غلظت ۱ میلی گرم در لیتر آن در مقایسه با غلظت ۰/۵ میلی گرم درلیتر، نتایج نسبتاً ضعیفتری را نشان داد (جدول ۴-۴). احتمالاً مقادیر نسبتاً بالایی از هورمون اکسین داخلی که برای فرایند ریشه زایی لازم است در فلس های این گونه ها وجود دارد و اضافه کردن میزان زیاد از یک اکسین خارجی باعث به هم خوردن تعادل هورمونی داخلی می شود. حتی به نظر می رسد اضافه کردن مقادیر کمتر از ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA به محیط، باعث ظهور نتایج بهتری گردد. البته مواردی چون اختلاف در نوع گونه، زمان تهیه ریزنمونه، اختلاف در سن، و مراحل رشد نیز در این امر تأثیر دارند (Niimi, 1985). به عنوان مثال کاربرد NAA در تکثیر گیاه آماریلیس سبب کاهش طول ریشه های اولیه گردید ولی استفاده از IBA در همین گیاه توانست به خوبی سبب افزایش تعداد ریشه بدون کاهش طول آن گردد (Fernando, 1994). Manreet Sooch et al, (1998) نشان دادند که محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA، مناسب ترین محیط کشت برای ریشه زایی *L. Diathus*



caryophyllus می باشد. Park (1996) نیز پس از به کارگیری چندین اکسین به جهت ریشه دار کردن چند گونه لیلیوم مشاهده کرد که هورمون IBA در بین سایرین به خوبی تعداد و طول ریشه ها را افزایش داد.

۵،۴،۲.گونه *L. ledebourii* (Baker) Boiss

در مورد گونه سوسن چلچراغ، هورمون های BA و NAA، نه در اختلاط بلکه به صورت جدا به محیط های کشت اضافه شدند و اثر آنها بررسی گردید (جدول ۱-۴). هر دو هورمون در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر در مقایسه با محیط کنترل موجب تشکیل پیازچه های بیشتر که دارای تعداد فلس و وزن تر بیشتری بودند گردیدند. از طرفی حضور BA به وضوح ریشه زایی را سرکوب کرد، برعکس وجود NAA در محیط باعث افزایش چشمگیر پیازچه های ریشه دار شد (جدول ۳-۴). به علاوه، تشکیل مقادیر زیادی توده های کالوس که قدرت جوانه زایی بالایی داشتند در حضور ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA دیده شد که مقدار آن در محیط حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BA بسیار ناچیز بود و در محیط کنترل هم اصلاً تشکیل نشد. افزایش ۱۰ برابری غلظت BA و NAA همانطور که قابل انتظار بود باعث تشکیل مقادیر کاملاً بیشتر توده های کالوس و تعداد کمتر پیازچه شد که به دلیل غلظت بالای این هورمون ها قدرت جوانه زایی این کالوس ها نیز مشخصاً کاهش یافته بود و اکثر پیازچه های تشکیل شده نیز شکل طبیعی نداشتند (جدول ۲-۴). درغلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA پیازچه ریشه داری دیده نشد برعکس در محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر NAA تقریباً اکثر کالوس ها به جای جوانه زایی مستقیماً ریشه زایی کرده بودند. از نظر



میانگین تعداد فلس و وزن تر هر پیازچه، هر دو هورمون برای هر دو شاخصه مقادیر بیشتری را نسبت به غلظت کنترل نشان دادند لکن در مقایسه با آنکه تعداد فلس های پیازچه های حاصل از غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA تقریباً با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر آن برابر بود، ولی فلس های پیازچه های تشکیل شده در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA کاملاً غیر طبیعی و نازک و برگی شکل بودند (به وضوح سبکتر از فلس های ذخیره ای طبیعی) و این موجب می گردید تا میانگین وزن پیازچه های ۱ میلی گرم در لیتر مشخصاً کمتر از وزن پیازچه های ۰/۱ میلی گرم در لیتر این هورمون باشد. پیازچه های تشکیل شده در محیط حاوی ۱ میلی گرم درلیتر NAA نیز گرچه تا حدودی با پیازچه های طبیعی فرق داشتند ولی فلس های آنها حالت ذخیره ای خود را حفظ کرده بودند و به همین دلیل غلظت ۱ میلی گرم درلیتر NAA با داشتن میانگین تعداد فلس بیشتر نسبت به غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر آن دارای پیازچه های سنگینتر و در واقع سنگین ترین پیازچه ها شد. انتقال این پیازچه ها به محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA نیز به خوبی و بدون تحریک رشد هر گونه توده کالوس مزاحمی باعث تولید ریشه های جدید و رشد طولی مناسب آنها گردید.

نیازی به ذکر نیست که آنچه تا کنون در مورد نتایج مشاهده شده در مورد سوسن چلچراغ بیان شد با تحقیقات قبلی انجام شده مطابقت دارد (رجوع شود به گزارشاتی که در قبل در همین موارد برای سه گونه اول لیلیوم مورد آزمایش ذکر گردید). البته اشاره ای به فقط دو تحقیق منتشر شده ای که بر روی کشت بافت گونه سوسن چلچراغ انجام گردیده است می شود. در تحقیق اول (Ghazvini *et al*, 2005) فلس های سوسن چلچراغ را به دو بخش بالایی و پائینی تقسیم کرده سپس ریزنمونه های حاصل از هر بخش را بر روی



محیط MS حاوی مقادیر صفر، ۰/۰۱ ، و ۰/۱ میلی گرم در لیتر از هر یک از هورمون های رشد NAA و BA قرار دادند. بیشترین تعداد پیازچه از ریزنمونه های بخش پائینی فلس و در محیط فاقد هورمون های رشد تشکیل شدند. بیشترین میزان ریشه زایی نیز در محیط حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA که به آن BA اضافه نشده بود مشاهده شد. گرچه در تحقیق مذکور بیشترین تعداد پیازچه در غلظت کنترل حاصل شد (که در تعارض با نتایج تحقیق حاضر و بسیاری از پژوهش های انجام شده قبلی می باشد) ولی همانطور که قبلاً نیز ذکر گردید، این تفاوت می تواند ناشی از عواملی چون اختلاف در تیمار سرمایی قبل از فلس برداری، طول دوره کشت، زمان تهیه ریزنمونه، سن فیزیولوژیکی و یا فصل نمونه برداری باشد (Niimi, 1985). در دومین تحقیق انجام شده بر روی همین گونه که نتایج آن مؤید دلایل فوق است (Khosh-khui and Azadi, 2007) تعدادی پیاز در هر یک از فصول بهار، تابستان، و زمستان تهیه گردیده و ریزنمونه های حاصل از آنها بر روی محیط MS که حاوی ترکیبی از ۳۰، ۶۰، یا ۹۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۱ یا ۰/۵ میلی گرم در لیتر از هر دو هورمون NAA و BA بود کشت داده شدند. نتایج نشان داد که گرچه در ریزنمونه های زمستانی بیشترین تعداد پیازچه در محیط فاقد هورمون به دست آمد ولی در ریزنمونه های بهاری بیشترین تعداد در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر از هر دو هورمون رشد مذکور و در ریزنمونه های تابستانی بیشترین تعداد در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. محققین در نهایت به این نتیجه رسیدند که زمستان مناسبترین فصل برای نمونه برداری بود و ریزنمونه های زمستانی در محیط حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۱ میلی گرم از هر دو هورمون BA و NAA سنگینترین و قطورترین پیازچه ها را ایجاد



کردند که به خوبی نیز ریشه دار شده و پس از یک دوره سرمایی کوتاه به سرعت در خاک گیاهچه تولید نمودند. در مورد شکل غیر طبیعی و برگی شکل فلس ها، Maesato *et al*, (1994) نیز در تحقیقی که بر روی *L. japonicum* Thunb انجام دادند به وضعیت مشابهی برخورد کردند: ریزنمونه هایی که بر روی محیط MS حاوی غلظت های بالای هورمون های رشد کشت شده بودند پیازچه هایی تولید نمودند که برگ هایی از ناحیه صفحه تحتانی (Basal plate که محل رویش فلس ها می باشد) پیازچه ایجاد کردند. آنها در ادامه تحقیق پی بردند که این برگ ها در واقع همان فلس های پیازچه ها بودند که به حالت غیر ذخیره ای تغییر شکل یافته و فرم کاملاً برگی شکل به خود گرفته بودند. آنها این مشکل را به راحتی و با انتقال ریزنمونه ها به محیط فاقد هورمون مرتفع ساختند.

۵،۵. رکود پیازچه ها

نکته قابل بحث دیگر اینکه از چهار گونه کشت شده در محیط مصنوعی، بیشتر پیازچه های گونه اول("Acapulco") در لوله آزمایش به خوبی رشد کرده و گیاهچه های نسبتاً بلندی تولید کردند، ولی در تعدادی دیگر یا فقط تعدادی برگ های کوتاه تولید شد و یا اینکه اصلاً هیچ گونه گیاهچه ای ایجاد نگردید. این پیازچه ها پس از انتقال به خاک، در تمام مدت نگهداری در اتاق سازگاری، و همچنین در گلخانه هیچ گونه رشدی را نشان ندادند. از طرفی تمام پیازچه های حاصل از گونه دوم ("Ceb Dazzle") و سوم ("Tresor") در تمام طول مدت کشت، ریشه زایی، انتقال به خاک و سازگاری، و انتقال به گلخانه به خوبی رشد کرده و گیاهچه های بلندی تولید نمودند که پس از گذشت دو ماه



در گلخانه طول آنها به بیش از 15 cm رسید. در مورد اکثر قریب به اتفاق پیازچه های حاصل از کشت بافت ریزنمونه های فلسی سوسن چلچراغ، اصولاً تولید گیاهچه ای مشاهده نشد. پیازچه ها پس از ریشه دار شدن به خاک انتقال یافتند ولی حتی یک ماه پس از انتقال به گلخانه نیز رشد گیاهچه ای در پیازچه های کاشته شده دیده نشد.

زمانی از سال که ریزنمونه گرفته می شود در اکثر موارد بر نتایج حاصل از ریزافزایشی اثر می گذارد. دگرگونی های دمائی، طول روز، شدت نور، و در دسترس بودن آب در تمام سال بر میزان کربوهیدرات ها، پروتئین ها، و فاکتورهای رشد در گیاه مادری اثر دارند که خود متعاقباً، بر واکنش های ریزنمونه های حاصل از آن در درون شیشه نیز مؤثر است. به نظر می رسد بهترین نتیجه هنگامی قابل دستیابی است که در حالت رشد فعال گیاه ریزنمونه گرفته شود. تنها مورد استثناء هنگام گرفتن ریزنمونه از اندام ذخیره ای است. در واقع توانایی باززایی ریزنمونه ها به فصلی از سال بستگی دارد که در آن از اندام ذخیره ای، بافت گیاهی مورد نیاز برای تهیه ریزنمونه ها فراهم می شود. در این مورد بهتر است ریزنمونه ها را از بافت گیاهی که در حال گذراندن دوره رکود در رشد است تهیه کرد. مشخصاً از نظر فیزیولوژیک، اندام ذخیره ای هنگامی که فعال می شود شروع به مصرف کربوهیدرات ها وسایر مواد ذخیره شده در بافت خود کرده و این مواد را صرف رشد ساقه جدید می کند. هرچه ساقه بیشتر رشد می کند اندام ذخیره ای بیشتر تحلیل می رود و نتیجتاً ریزنمونه ای که دیرتر (یعنی از اندام تحلیل رفته) تهیه شود نیز پتانسیل باززایی کمتری خواهد داشت زیرا بیشتر مواد مغذی و هورمونی لازم برای شروع جوانه زنی را مصرف نموده است (خوشخوی، ۱۳۷۷). در پژوهشی بر روی همین موضوع، ریزنمونه هایی



از قطعات فلسی پیاز *L. speciosum* بر روی محیط MS کشت شدند. نتیجه این بود که ظرفیت باززایی ریزنمونه ها کاملاً به فصل وابسته بود. بدین سان که ریزنمونه ها در هر چهار فصل بهار، تابستان، پاییز، و زمستان تهیه شدند و میزان باززایی به ترتیب ۷۲، ۰، ۵۶، و ۲ درصد ثبت گردید (Robb J M, 1957). در تحقیق حاضر هم سه نوع لیلیوم کشت شده تقریباً با فاصله زمانی یک ماه از یکدیگر کشت شدند، بدین ترتیب که پیازی که گروه اول از آن کشت شدند ("Acapulco") تازه سبز شده و مریستم نوک ساقه آن فعال شده بود در حالیکه پیاز نوع دوم ("Ceb Dazzle") یک ساقه کوتاه در حدود ۴ سانتی متر داشت و پیاز لیلوم نوع سوم ("Tresor") گیاه بلندی تولید نموده بود و تا حدودی تحلیل رفته به شمار می رفت. ریزنمونه های چلچراغ نیز از پیازی کشت شدند که اصلاً سبز نشده بود. ملاحظه می شود که بافت گیاهی که ریزنمونه های هر گونه از آنها تهیه شده اند در شرایط متفاوت فیزیولوژیک قرار داشته است. احتمالاً همین باعث شده که پیازچه های حاصل از چهار گونه هم در شرایط *in vitro* و هم خارج از شیشه میزان رشد متفاوتی را نشان دهند.

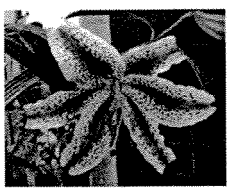
نکته دیگر اینکه در حالت رکود بافت گیاهی وارد یک دوره تعلیق موقتی رشد می شود که در آن علائم حیاتی نیز به کمترین میزان خود تنزل می کنند (Juntilla, 1988). لیلیوم *Lilium* sp. یکی از گیاهانی است که معمولاً در ابتدای فصل سرما و پس از خشک شدن اندام های هوایی وارد دوره رکود شده این دوره تا ابتدای فصل گرما و گلدهی بعدی ادامه دارد. نکته قابل توجه اینکه تقریباً همه گیاهانی که وارد رکود می شوند برای شکستن این حالت و رشد دوباره نیاز به یک دوره سرما (non-freezing) دارند. فرایند قرار دادن



ایـــن گیاهـــان در معـــرض تیمـــار ســـرمایی بـــرای مـــدت زمـــان خـــاص،" بهـــاره ســـازی (Vernalization)" نامیـــده مـــی شـــود (Purvis and Gregory, 1937; 1952; Purvis, 1961). پاسخ پیازهـای لیلیـوم بـه بهـاره سـازی بـه صـورت کـاهش زمـان لازم بـرای گلـدهی مـی باشـد (Roh and Wilkins, 1977a; 1977b; Roh, 1985). تحقیقـات متعدد نـشان داده انـد کـه در بـسیاری از گونـه هـای لیلیـوم پیازچـه هـایی کـه از طریـق کـشت بافـت و در شـرایط *In vitro* حاصـل مـی شـوند نیـز بـه حالـت راکـد (dormant) بـوده و تـا وقتـی بـرای مـدتی در معـرض تیمـار سـرمایی قـرار نگیرنـد از ایـن وضـعیت رهـا نـشده و گیاهچـه ای تولیـد نمـی نماینـد؛ در تحقیقـی کـه Delvallee *et al.* (1990) بـر روی کـشت بافـت ریزنمونـه هـای فلـسی *L. speciosum* Thunb cv. Rubrum انجـام دادنـد مـشاهده کردنـد کـه پیازچـه هـای حاصـل شـده در دمـای ۲۰ و ۲۵ درجـه سـانتیگراد همـه راکـد بودنـد ولـی پیازچـه هـای تـشکیل شـده در دمـای ۲۵ درجـه نـسبت بـه ۲۰ درجـه چنـد هفتـه زودتـر وارد وضـعیت رکـود مـی شـدند. وقتـی ریزنمونـه هـای کـشت شـده را در دمـای ۱۵ درجـه قـرار دادنـد متوجه شدند کـه هـیچ یـک از پیازچـه هـا حالـت راکـد نداشـته و همـه آنهـا هـم در محـیط کـشت و هـم پـس از انتقـال بـه خـاک بـه خـوبی رشـد کـرده و گیاهچـه هـای بلنـدی تولیـد نمودنـد. بـر ایـن اسـاس پیـشنهاد کردنـد کـه دمـای بـالاتر از ۱۵ درجـه سـانتیگراد باعـث بـروز وضـعیت رکـود در پیازچـه هـای تـشکیل شـده در کـشت بافـت مـی شـود و بـا افـزایش دمـا تعـداد پیازچـه هـای راکـد بیـشتر و سـرعت وقـوع ایـن حالـت تـشدید مـی گـردد. گرچـه بـه نظـر مـی رسـد ایـن وضـعیت در همـه گونـه هـای لیلیـوم دیـده نمـی شـود و یـا اینکـه حـداقل سـرعت و زمـان وقـوع آن متفـاوت مـی باشـد. بـه عنـوان مثـال در تحقیقـی دیگـر کـه Jakobsone and Andersone (1997)



بر روی تعدادی از گونه های Asiatic lily و Trumpet lily انجام دادند مشاهده کردند که پیازچه های کاملاً فعال در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتیگراد حاصل شده که به رشد خود در وضعیت *ex vitro* (خارج از محیط کشت و درون خاک) به خوبی ادامه دادند. به هر حال اکثر محققین معتقدندکه یک دوره ۱ تا ۳ ماهه تیمار سرمایی بین ۱ تا ۱۰ درجه سانتیگراد باعث رهایی پیازچه ها از وضعیت رکود می شود (Stimart *et al.*,1982; Higgins and Stimart, 1990; Aguettaz *et al.*, 1990; Geert *et al.*, 1996; Weon *et al.*, 1998; Yae *et al.*, 2001; Langens-Gerrits *et al.* 2003; Khosh-khui and Azadi, 2007). حتی Higgins and Stimart (1990) و Ievinsh *et al* (2003) نشان دادند که اگر پیازچه های برخی از گونه های Asiatic lily هم که ظاهراً در دمای بالا در شرایط *In vitro* پیازچه های راکد تولید نمی کردند در معرض تیمار سرمایی قرار گیرند، سرعت تولید گیاهچه و رشد آنها در شرایط *ex vitro* به مقدار زیادی افزایش می یابد. در واقع آنچه در دورن فلس های پیازچه ها در دوره تیمار سرمایی (بهاره سازی) به وقوع می پیوندد فرآیندی است به نام Low "Temperature Sweetening" یا LTS (Miller and Shin *et al*, 2002; Rees *et al*, 1981; Langhans, 1990). در این فرآیند کربوهیدرات اصلی، که پیاز (یا پیازچه) لیلیوم در طی دوران رشد و فعالیت در خود ذخیره می کند و نشاسته می باشد، در نتیجه تیمار سرمایی و فعال شدن آنزیم های "α و β آمیلاز" در درون فلس ها شکسته شده به قندهای کوچکتر ساکارز، فروکتوز، و گلوکز تبدیل می گردد. بدون شک غلظت بالای این قندها (به خصوص ساکارز) در فلس ها، به عنوان یک منبع انرژی کاملاً در دسترس برای پیازچه ها بوده و در نتیجه پس از قرار گرفتن در شرایط *ex vitro* به راحتی



با استفاده از آنها شروع به رشد می نمایند، مضافاً زمان کافی برای سازگار شدن ریشه ها فراهم می شود (Cochrane *et al.*, 1991; Cottrell *et al.*, 1993; Claassen *et al.*, 1993; Hill *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997).

از آنچه تا کنون گفته شد می توان نتیجه گرفت که پیازچه های سوسن چلچراغ و تعدادی از پیازچه های گونه "Acapulco" که گیاهچه ای از آنها حاصل نشد در وضعیت رکود بوده و احتمالاً با چند هفته تیمار سرمایی این حالت برطرف شده و گیاهچه ها رشد می نمایند. Khosh-khui and Azadi (2007) هم دقیقاً همین وضعیت را در پیازچه های سوسن چلچراغ که در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد حاصل شده بودند مشاهده کردند؛ آنها نشان دادند که تیمار سرمایی این پیازچه ها در دمای ۴ درجه به مدت ۶ هفته به خوبی موجب مرتفع شدن این مشکل می شود. به نظر می آید که اگر پیازچه های گونه های دیگر مورد آزمایش که گیاهچه تولید نمودند، نیز در معرض تیمار سرمایی قرار داده می شدند سرعت تولید گیاهچه و رشد آنها افزایش می یافت.

۵،۶. سازگاری

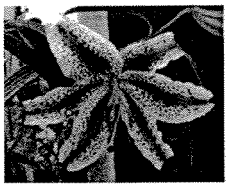
با توجه با اینکه شرایط داخل شیشه کاملاً با شرایط محیط خارج از آن به خصوص از نظر میزان رطوبت و محیط کشت متفاوت می باشد، انتقال گیاهچه های کشت بافتی به صورت مستقیم و فوری به گلخانه یا مزرعه نتیجه ای جز از بین رفتن ناگهانی آنها ندارد. در نتیجه باید شرایطی را فراهم نمود که طی آن گیاهچه های حاصل از کشت بافت به تدریج با محیط *ex vitro* سازگار شوند. به طور کلی گیاهان رشد یافته درون شیشه هم از نظر



ساختاری و هم از جنبه فیزیولوژی در چندین عامل که مهمترین آنها میزان فتوسنتز پائین، نازک بودن لایه موم بشره ای[1] روی برگ ها، کنترل غیر مؤثر روزنه ها، و کامل نبودن ساختار تارهای کشنده ریشه ها می باشد، با گیاهان رشد یافته در گلخانه یا مزرعه متفاوت هستند (خوشخوی ۱۳۷۳). گیاهچه های رشد یافته درون شیشه، اشباع از کربوهیدراتی می باشند که به وفور در محیط کشت در دسترس آنها بوده است و به طور کلی فقط بخش اندکی از نیاز کربوهیدرات خود را با استفاده از تثبیت CO_2 فتوسنتزی تولید می نمایند. Grout and Aston (1978) دریافتند که میزان تثبیت CO_2 در گیاهچه های گل کلم، ۷ روز پس از انتقال به آمیخته های خاکی، نسبت به شرایط درون شیشه افزایش یافت. اما این گیاهچه ها هنوز CO_2 بیشتری در قیاس با آنچه در فتوسنتز تولید می کردند داشتند. تنفس تاریکی آنها نیز بیشتر از دانهال های[2] همسن آنها بود. این نشانگر اینست که گیاهک های تازه انتقال یافته، انرژی زیادی در سازگار شدن با محیط جدید مصرف می کردند. یک توازن کربنی مثبت در گیاهچه های گل کلم، ۱۴ روز پس از انتقال مشاهده شد.

نازک بودن لایه موم بشره ای در گیاهان حاصل از کشت بافت موجب از دست دادن آب بیشتر این گیاهان از سطوح برگ ها نسبت به گیاهان معمولی می شود. رطوبت نسبی زیاد در شیشه های کشت ممکن است باعث کاهش تشکیل موم بر سطح برگ ها شود. لکن Sutter and Langhans (1978; 1979) با بررسی گیاهچه های کشت بافتی چندین گونه از میخک مشاهده کردند که هم رطوبت نسبی کم و هم میزان نور کم گرایش دارند که میزان تشکیل موم را پایین آورند. آنها به این نتیجه رسیدند که موم بشره ای در جوانه های درون شیشه ای همه گونه های مورد بررسی، کاهش نمی یابد و از طرفی بقاء

[1] Cuticular wax
[2] Seedlings

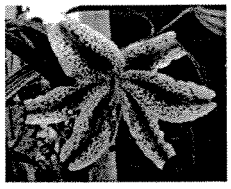


گیاهچه های انتقال یافته هم همیشه با وجود یا عدم وجود موم بشره ای مرتبط نیست. در مورد کنترل غیر مؤثر روزنه ها Wardle *et al* (1979, 1983) گزارش کردند که روزنه ها در برگ های گل کلم در گیاهچه هایی که از کشت درون شیشه ای به دست آمده بودند قادر به بسته شدن در واکنش با ABA (آبسیزیک اسید) نبودند.

برای سازگار کردن ریشه ها، قبل از انتقال آنها به خاک معمولاً آنها را در گلدان هایی که حاوی مخلوطی از آمیخته های خاکی می باشد قرار می دهند؛ این آمیخته ها معمولاً شامل موادی مانند پیت[1]، پرلیت[2]، ورمی کولایت[3]، پامیس[4]، و پوست درخت است که به آنها مقدار اندکی کود یا آهک افزوده می شود.آمیخته خاک بهینه دارای pH خنثی تا کمی اسیدی بوده و گنجایش نگهداری آب زیادی دارد در حالیکه از زهکش و تهویه خوبی برخوردار است. برای سازگار کردن برگ ها (در واقع اندام های خارج از خاک) معمولاً آنها را در یک جعبه یا کیسه پلاستیکی روشن[5] یا در زیر مه افشان نوبتی[6] قرار می دهند. سپس با کاهش مقدار مه افشانی یا باز کردن تدریجی کیسه های پلاستیک، آنها را به تدریج با رطوبت هوای بیرون سازگار می نمایند (خوشخوی۱۳۷۷).

روشی که در تحقیق حاضر برای سازگار کردن گیاهچه ها به کار برده شد مطابق با آنچه بود که در بالا ذکر شد. رشد نکردن گیاهچه ها در طول دوران سازگاری ممکن است دلالت بر این داشته باشد که احتمالاً گیاهچه ها در این فاصله مشغول سازگار کردن خود با محیط بیرون از نظر عواملی مانند میزان فتوسنتز، ضخامت لایه موم بشره ای، و ساختمان

[1] Peat
[2] Perlite
[3] Vermiculite
[4] Pumice
[5] Transparent
[6] Intermittent mist



ریشه و تارهای کشنده آن بوده اند. اکثر این گیاهچه ها یک تا دو هفته پس از انتقال به گلخانه به خوبی شروع به رشد کردند.

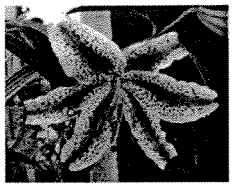
۵,۶,۱. سازگاری سوسن چلچراغ با منطقه (سهیلیه) کرج

مشاهدات نشان داد که منطقه سهیلیه کرج (که از مساعدترین نقاط به نظر می آمد) از نظر رطوبت هوا، درجه حرارت و البته ارتفاع برای گیاه مورد نظر مناسب نمی باشد. در واقع همه شرایط مذکور، پایین تر از آنچه که در محیط بومی گل سوسن چلچراغ اندازه گیری شد، بودند و مشخصاً تغییر ناگهانی محیط زندگی این گل باعث شد تا قدرت سازگاری با محیط جدید را نداشته باشد و تدریجاً کم آب شده و نهایتاً خشک شود. از طرف دیگر تشکیل پیازچه های جدید از پیازهای کاشته شده اولیه که انتظار می رفت همه آنها نیز پوسیده باشند نشان می دهد که خاک منطقه سهیلیه بسیار مناسب و مساعد برای تکثیر پیاز گل سوسن چلچراغ در آن می باشد. البته بررسی این موضوع که آیا این پیازها و پیازچه های جدید حاصل از آنها در بهار آینده قدرت تشکیل پایه های گیاهی مناسب را که تا حدی سازگار با شرایط محیطی منطقه کرج باشند دارند موضوعی است که باید به بهار آینده موکول شود.

همانطور که ذکر گردید پیازچه های سوسن چلچراغ که از طریق کشت بافت حاصل شدند هیچ یک حتی پس از ریشه دار شدن و انتقال به گلخانه گیاهچه ای ایجاد نکردند اگرچه هیچ یک نیز هنوز خشک نشده اند. یک دلیل ممکن است ندادن تیمار سرمایی باشد که ذکر گردید ولی شاید دلیل دیگر آن همین مسئله عدم تطابق شرایط گلخانه با شرایط



محیط بومی این گل باشد. هر دو موضوع (تیمار سرمایی و شرایط محیطی) نیاز به آزمایش و تحقیق بیشتر دارد.



پیشنهادات

مطالعات آینده با استفاده از

- سایر هورمون های رشد مانند ABA ، PBZ ، TA
- غلظت های مختلف محیط MS (۱/۴ ، ۱/۲ ، ۳/۲ ، ...)
- دماهای متفاوت کشت (۱۵-۳۰°C)
- سایر بافت های گیاه مانند ساقه، برگ، غنچه و اندازه های متفاوت ریزنمونه
- کشت مریستم به منظور تولید گیاهان عاری از ویروس
- سیستم کشت مایع و مقایسه بازدهی و میزان آلودگی آن با کشت نیمه جامد
- نورهایی با طول موج متفاوت و میزان فتوپریود مختلف
- میکروفلس های به دست آمده از طریق کشت بافت به عنوان ریزنمونه هایی که دارای آلودگی سطحی نبوده و نیاز به ضدعفونی جدید ندارند
- غلظت های بالاتر NAA و BA و بررسی تأثیرات آنها بر میزان باززایی ریزنمونه ها
- کالوس های به دست آمده برای تولید مقادیر بیشتر کالوس که بتوان از آنها تعداد فراوانی پیازچه گرفت
- آزمایشات باکتریولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی برای شناسایی دقیق گونه باکتری کلبسیلا و تأثیرات مثبت یا منفی آن بر روی گیاه سوسن چلچراغ ، موردی که تا کنون از دید محققین این گیاه پنهان بوده است

به منظور افزایش قابلیت های تکثیر و بالا بردن کیفیت پیازچه ها و مهمتر از همه نجات یکی از گیاهان ژرم پلاسم اندمیک و در حال انقراض کشور صورت پذیرد.



فرهنگ اصطلاحات

Abaxial	نامحور سو: پشت به طرف یا خط مرکزی یا برگشته به طرف پائین
Activated charcoal	زغال فعال : ماده ای جاذب که ترکیبات آزاد شده از بافت ریزنمونه را جذب می نماید.
Adventitous	نابجا : صفتی که نمو ساختارهای رویشی را از موقعیت های غیر طبیعی توصیف می کند.
Apical dominance	غالبیت انتهایی : پدیده ای که بر اساس آن جوانه انتهایی یک شاخساره مانع از رشد جوانه های جانبی آن می شود.
Aseptic culture	کشت سلول ها، بافت ها، یا اندام ها در محیط کشت استریل.
Asexual propagation	تکثیر غیر جنسی : ازدیاد گیاهان بدون دخالت سلول های جنسی.
Autoclave	اتوکلاو : دستگاهی برای استریل کردن محیط کشت، ظروف شیشه ای و غیره که از هوای گرم و مرطوب تحت فشار استفاده می کند.
Auxins	اکسین ها : گروهی از تنظیم کننده های رشد گیاهی که باعث طویل شدن سلول و در بعضی موارد، تقسیم سلولی می شوند.
Basal medium	محیط کشت پایه : محیط کشت حاوی مواد آلی و عناصر معدنی اما فاقد هر گونه افزودنی دیگر از جمله مواد تنظیم کننده رشد.
Bulb	پیاز : یک اندام تخصص یافته زیرزمینی که محور کوتاه، گوشتی و معمولاً عمودی ساقه (صفحه تحتانی) را شامل می شود.

Bulblet

پیازچه : اندام کوچک پیاز مانندی که از رشد مریستم جانبی روی صفحه پایگاهی بوجود آمده و در واقع پاگیاهی است که پس از نمو کامل به پیاز تبدیل می شود.

Bulbil

پیازچه هوایی : پیاز کوچکی که در محور برگها تشکیل شده یا در محل گل در روی گل آذین قرار می گیرد.

Callus

پینه یا کالوس : توده ای از سلول های تمایز نیافته در حال تقسیم که اغلب در محل زخم ها و جراحت های وارده به بافت ها تولید می شود.

Clone

همگروه : مجموعه گیاهانی که به طریقه رویشی از یک گیاه حاصل شده باشند و همگی نژاد یکسانی دارند.

Contractile root

ریشه متراکم : ریشه های ضخیم تخصص یافته که می توانند بخش های بالایی را به علت تغییر شکل در سلول های پوششی از سطح خاک به پائین بکشند تا پداژه ها، پیازها، ریزوم ها، و غیره در عمق مناسب قرار گیرند.

Cormlet

پداژک : پداژه کوچکی که در صفحه پایگاهی پداژه تولید شده و پس از رشد به پداژه کامل تبدیل می شود.

Cytokinins

سایتوکینین ها : گروهی از تنظیم کننده های رشد گیاهی که سبب تحریک تقسیم سلولی و به تأخیر افتادن پیری می شوند.

Detergent دترژنت : موادی که کشش سطحی یک محلول را پایین می آورند.

Distilled water آب مقطر : آبی که حاوی هیچگونه ترکیب آلی یا معدنی نیست.

Disinfection گندزدایی : خذف میکروارگانیسم ها از طریق ضدعفونی سطحی.

Embryoid رویانواره : ساختار رویان مانندی که از فرآیند رویانزایی بدنی حاصل می گردد.

Endemic بومی : ویژگی گیاهی که به طور طبیعی با منطقه جغرافیایی خاصی سازگار شده باشد.

Epigeous روخاکی : ویژگی گیاهی که پس از روئیدن، لپه های آن به دلیل طویل شدن بخش زیر لپه بالای خاک قرار می گیرند.

Eiolation تاریک رویی : رشد دوکی شکل باریک و سفید گیاهان در غیاب نور.

Explants ریزنمونه : قطعه ای از بافت یا اندام گیاهی که برای شروع کشت مورد استفاده قرار می گیرد.

Flaming روشی برای سترون کردن ابزار و ادوات فلزی با استفاده از شعله.

Floriculture

گلکاری : کشت و پرورش گیاهان گلدار و زینتی در هوای آزاد یا گلخانه.

Germinator

ژرمیناتور : دستگاهی برای نگهداری کشت ها با دما، نور، و رطوبت کنترل شده.

Gibberlins

جیبرلین ها : گروهی از هورمون های گیاهی که در قارچ ها و گیاهان عالی یافت می شوند و باعث طویل شدن سلول و تقسیم سلولی می گردند.

Heterotrophs

هتروتروف : ارگانیسمی که قادر به تأمین مواد آلی لازم برای رشد خود از مولکول های معدنی ساده نباشد و نیاز دارد که آنها را از محیط اطراف خود به دست آورد.

Hypogeous

زیرخاکی : ویژگی گیاهی که پس لپه های آن به دلیل کوتاه ماندن بخش زیرلپه، زیر خاک می ماند.

In vitro

درون شیشه ای : معمولاً برای توصیف کشت بافت ها، اندام ها، و ... بر روی محیط کشت مصنوعی در شرایط استریل مورد استفاده قرار می گیرد.

Laminar air flow cabinet

محفظه مخصوصی که هوای استریل به طور دائم در آن جریان دارد.

Liliaceae

تیره بزرگی از رده تک لپه ای ها که دارای شش پرچم، برگ

هـای باریـک بـا رگبـرگ هـای مـوازی و تخمـدان فوقـانی هـستند. مانند سوسن، پیاز، و سیر.

Lux

لـوکس : شـدت نـور دریافـت شـده از یـک شـمع بـر روی یـک صفحه یک متر مربعی در فاصله یک متری.

Macroelements

عناصـر پـر مـصرف : عناصـر پـر مـصرف گیاهـان نظیـر N, P, K, Ca, Mg کـه در محـیط کـشت نیـز در مقـادیر زیـاد مـورد نیـاز مـی باشد.

Meristem

سلول هـای در حـال تقـسیم و فعـال بافـت تمـایز نیافتـه یـک ارگانیـسم که منشأ تمامی بافت های تمایز یافته می شوند.

Microelements

عناصـر کـم مـصرف : عناصـر ضـروری کـم مـصرف گیاهـان نظیـر Fe, Mn, Zn, B, Cu; کـه در محـیط کـشت نیـز در مقـادیر کـم مورد نیاز می باشند.

Micropropagation

ریزازدیادی : تکثیـر رویـشی گیاهـان بـا اسـتفاده از فنـون کـشت بافـت در شرایط درون شیشه ای.

Medium

محـیط کـشت : ترکیـب مـایع یـا جامـد آبگونـه آب، عناصـر معـدنی، و ترکیبات آلی برای رشد سلول ها، بافت ها، و یا اندام ها.

Organogenesis

انـدام زایـی: نمـو شاخـساره یـا ریـشه نابجـا و تغییراتـی را در سـلول شامل می شود که منجر به توسعه یک ساختار تک قطبی مثل سر

آغازه ساقه یا ریشه می گردد.

Peat پیت : بقایای گیاهان مردابی، لوشاب و خلیش که در زیر آب در حالتی نیمه پوسیده باقی مانده اند و در بسترهای کشت استفاده می شود.

Photperiod دوره نوری : واکنش یک گیاه به طول روز یا دوره روشنایی

Photosynthesis فتوسنتز : ساخت هیدرات های کربن از مولکول های ساده در حضور نور توسط گیاهان.

Plant Growth Regulators (PGR) تنظیم کننده های رشد : گروهی از ترکیبات شیمیایی طبیعی یا مصنوعی که باعث تحریک، ممانعت یا به طور کلی تغییر رشد گیاهان می شوند.

Primordium سر آغازه: اولین مرحله قابل تشخیص اما تمایز نیافته یک اندام در حال نمو.

Proliferation پرآوری : تشکیل سریع و مکرر بافت ها و اندام های جدید.

Propagule بازنمونه : قطعه کوچک تکثیر شده یک گیاه که برای تکثیر مجدد مورد استفاده قرار می گیرد.

Rosette کپه ای : ویژگی برخی از گیاهان علفی که برگ های آنها از روی پاهنگ برخاسته و بدون ساقه می باشند.

Scale فلس : برگ های تغییر شکل یافته ای که به عنوان اندام ذخیره ای گیاه عمل می کنند و دارای روزنه هستند.

Scaling فلس برداری : جدا کردن فلس از پیاز مادری و قرار دادن آنها تحت شرایط مناسب رشد به منظور تولید پیازچه های نابجا.

Scalpel چاقوی تیز و کوچک جراحی.

Scaly bulb پیاز بدون پوشش : پیازی که فلس هایش بدون پوشش بوده و جدا از هم قرار دارند و در برابر آسیب های محیطی حساس می باشند.

Seedling دانهال : نهالی که از بذر بوجود می آید.

Stock solution محلول پایه : محلول حاوی غلظت بالایی از ترکیبات محیط کشت.

Subculture واکشت : تقسیم کشت و انتقال آن به محیط تازه.

Surfectant یک ماده پاک کننده یا پخش کننده سطحی که نفوذ و در نتیجه تأثیر مواد شیمیایی استعمال شده را افزایش می دهد.

Tertiary ترشیاری : اولین دوره از عصر سنوزوئیک، در حدود ۶۵ میلیون سال قبل. در اواخر این دوره بازدانگان به خوبی به صورت ۲۶۰ تیره استقرار یافته و با تکامل حشرات همراه بوده است.

Tissue culture

کشت بافت : یک اصطلاح عمومی که به همه انواع کشت های گیاهی یا جانوری ضدعفونی شده که در محیط کشت انجام می شوند اطلاق می گردد.

Totipotency

پتانسیل یک سلول برای باززایی یک ارگانیسم کامل.

True to type

شبیه به اصل : گیاهانی که از نظر ظاهر و عملکرد با رقم مورد نظر شباهت قابل قبول دارند.

Tween

تویین : یک عامل مرطوب کننده که کشش سطحی بین ریزنمونه و ماده ضدعفونی کننده را کاهش می دهد.

فصل ششم

منابع

۶,۱. منابع فارسی

احسان پور, ع. ا., & امینی, ف. (۱۳۸۲). قهوه ای شدن در کشت بافت گیاهی. *کشت سلول و بافت گیاهی* (نسخه دوم, ص. ۴۹-۴۶). در اصفهان: انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان.

باقری, ع., زیارت نیا, م., & حسینی, م. (۱۳۸۳). جمع آوری نمونه گیاهی، نحوه استریل کردن، برش و کشت آن. *کشت بافت درختان (تألیف جی. ام. بونگا و پی. وی. ادرکاس)* (نسخه اول, ص. ۸۹-۸۸). در مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

خوشخوی, م. (۱۳۷۷). *فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی (تألیف کنت سی. تورز)* (نسخه دوم, ص. ۸۵-۸۲ و ۱۱۴-۱۱۲). در شیراز: انتشارات دانشگاه شیراز.

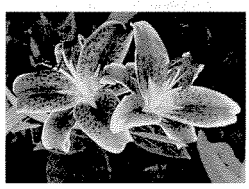
خوشخوی, م. (۱۳۷۳). مبانی و روش ها. *ازدیاد نباتات (تألیف هارتمن و همکاران)* (نسخه دوم, جلد ۳, ص. ۷۷۶). در شیراز: انتشارات دانشگاه شیراز.

روزبان, م. (۱۳۸۰). *ازدیاد درون شیشه ای برخی از ارقام گلابی آسیایی.* پایان نامه کارشناسی ارشد, دانشگاه تربیت مدرس, دانشکده کشاورزی , تهران.

زرگری, ع. (۱۳۷۲). *گیاهان دارویی* (جلد ۴, ص. ۹۶۹). در تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

شکرایی, ج. (۱۳۷۹). سوسن چلچراغ سلامی به خورشید. *شکار و طبیعت , ش ۶۳*, ص ۲۴.

طارم سری, م. (۱۳۷۹). *اینکوترمز ۲۰۰۰ قواعد رسمی اتاق بازرگانی بین المللی برای تفسیر*



اصطلاحات تجاری (ص. ۲۶۲). در مؤسسه مطالعات و پژوهش های بازرگانی.

فارسی, م., & ذوالعلی, ج. (۱۳۸۵). تکنیک های استریلیزاسیون. *اصول بیوتکنولوژی گیاهی (تألیف اچ. اس. چاولا)* (نسخه دوم, ص. ۳۶-۳۵). در مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

فهیمی, ح. (۱۳۷۶). *تنظیم کننده های رشد گیاهی* (نسخه اول, ص. ۱۷۲). در تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

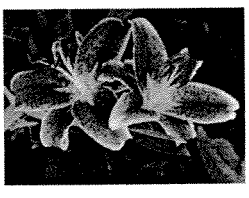
قهرمان, ا. (۱۳۷۰). *فلور رنگی ایران* (جلد ۱۶, ص. ۱۹۴۴). در انتشارات مؤسسه جنگل ها و مراتع.

کاظمی, خ., & صابری, و. (۱۳۷۷). *سوسن چلچراغ اثر طبیعی ملی محیط زیست* (ص. ۲۳). در رشت: انتشارات سازمان محیط زیست استان گیلان.

کافی, م., ایرانشاهی, ا., & خنجری, ن. (۱۳۸۰). بازار جهانی صادرات گل و گیاهان زینتی و مقایسه رون توسعه کلمبیا و ایران. *چکیده مقالات اولین سمینار علمی و کاربردی گل و گیاهان زینتی ایران* (ص. ۶۶). در نشر دفتر امور گل و گیاهان زینتی، قارچهای خوراکی و دارویی معاونت باغبانی جهاد کشاورزی.

معمار مشرفی, م. (۱۳۷۷). *اثر هورمون ها و شرایط محیطی روی رشد و نمو، تکثیر پیاز و دوام گل در لاله واژگون.* پایان نامه دکترای باغبانی, دانشگاه تربیت مدرس, دانشکده کشاورزی.

معینی, ا., & کهریزی, د. (۱۳۸۲). مزایای کشت بافت گیاهی. *کشت بافت گیاهی (اکرم م. تاجی، ویلیام ا. داد ، ریچارد ا. ویلیامز)* (نسخه اول, ص. ۲۸-۲۷). در تهران: انتشارات سازمان بسیج



دانشجویی.

ناصری, م. ت., & ابراهیمی, م. (۱۳۷۷). *فیزیولوژی گل های پیازی (تألیف دی هرتوق و لنارد مارسل)* (نسخه اول, ص. ۳۵۲). در مشهد: انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.



۶,۲. منابع خارجی

Adachi K, Nakatani, M., and Mochida, H. (2002) Isolation of endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. *Soil Science and Plant Nutrition* **48:** 889-895.

Aguettaz P, Paffen, A., Delvallée, I., van der Linde, P., and De Klerk, G-J. (1990) The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **22:** 167-172.

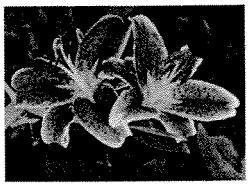
Ala A (1974) A lilium species in Iran. *In* E Napier, and Plah, J., ed, Lilies and other Liliaceae, pp 23-25.

Arteca RN (1996) Plant Growth Substances: Principles and Applications. Chapman and Hall, New York. USA.

Asao HS, Matutani, S., Tanaka, K., and Arai, S. (1992) Mcropropagation of *Lilium japonicum* Thunb. by scale culture. *Bulletin Nara Agriculture Experimental Station* **23:** 1-6.

Assmus B, Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawerence, J. R., and Hartmann, A. (1995) In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 1013-1019.

Bach A, Malik, M., Ptak, A., and Kedra, M. (2000) Light effects on



ornamental microplant shoots and bulbs quality. *Acta Horticulturae* **530:** 173-179.

Bagni N, Serafini, F. D., and Torriginai, P. (1982) Polyamines and cellular growth processes in higher plants. *In* LA Withers, and Alderson, P. G., ed, Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. Butterworths, U.K.

Baydar N (2006) Phenolic compositions of Grapevine shoot tips collected in different months and their effects on the explant browning. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*: 41-46.

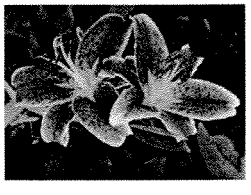
Bender A, and Pande, P. C. (2000). *In* R Kumar, ed, Intoductory Botany, New Dehki, India, p 992.

Benson EE, and Roubelakis - Angelakis K.A. (1992) *Plant Sci.* **84:** 83-90.

Brayan GB (1999) A colour atlas of Plant Propagation and conservation, Ed 2. Manson Publishing, USA.

Brickell C (1996). *In* A-Z Encyclopedia of garden Plant, Vol 2. Dorling Kinkersley, p 1080.

Cavalcante VA, and Dobereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogenfixing bacterium associated with sugar-cane. *Plant Soil* **108:** 23-31.



Chang C, Chen, C.T., Tsai, Y.C., and Chang, W.C. (2000) A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker. *Bot. Bull. Acad. Sin* **41:** 139-142.

Chelius MK, Triplett, E. W. (2000) Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:** 783-787.

Claassen PAM, Budde, M.A.W., and Van Calker, M.H. (1993) Increase in phosphorylase activity during coldinduced sugar accumulation in potato tubers. *Potato Res.* **36:** 205–217.

Clealand R (1987) Auxin and cell elongation. *In* PJ Davies, ed, Plant hormones and their role in plant growth and development, Boston, USA, pp 132-148.

Cochrane MP, Duffers, C.M., Allison, M.J., and Mackay, G.R. (1991) Amylolytic activity in stored potato tubers. 2. The effect of low temperature storage on the activities of a- and b-amylase and a-glucosidase in potato tubers. *Potato Res.* **34:** 333–341.

Corral JD, Gorolaliza, M., Marcos, C., Salinero, M., San-Feliciano, A., and Delcorral, J. (1995) Glycerol glucosides from *Lilium pyrenaicum*. *Fitoterapia* **66:** 371-372.

Cottrell JE, Duffers, C.M., Paterson, L., Mackay, G.R., Allison, M.J., and Bain, H., (1993) The effect of storage temperature on



reducing sugar concentration and the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato, Solanum tuberosum L. *Potato Res.* **36:** 107–117.

Dabrowski J, Dabski, M., and Kozak, D. (1992) The influence of some growth regulators on regenation of lily bulbs *in vitro*. *Acta Horticulturae* **325:** 537-541.

Dalal MA, Sharma B.B., and Grupta N. (1993) *Indian J. Agr. Sci.* **63:** 75-79.

Danto PK, and Bhojwani, S. S. (1995) *In vitro* corm formation and field evaluation corm derived plants of *Gladiolus*. *scientia Horticulturae* **61:** 115-129.

De Hortogh AA (1996) Marketing and research requirments for Lilium in North Amenrica. *Acta Horticulturae* **414:** 17-24.

De Hortogh AA, and Le Nard, M. (1993) World production and horticultural utilization of flower bullbs. *In* AA De Hortogh, and Le Nard, M., ed, The Physiology of flower bulbs. Elsevier Science, Netherlands, pp 21-28.

De Klerk GJ, Kim, K. S., and Davelaar, E. (1994) Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. *Physiol. Plant* **90:** 59-64.

De Klerk GJ, Kim, K. S., Schadewijk, M. V., and Gerrits, M. (1992)



Growth of bulblets of *Lilium speciosum* in vitro and soil. *Acta Horticulturae* **325:** 513-520.

Debberge P (1994) *In vitro* culture of ornamental plants. *In* IK Vasil, and Thorp, T. A., ed, Plant cell and tissue culture. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 561-573.

De-Fossard RA (1997) Reducing tissue culture costs for commercial propagation. *Acta Horticulturae* **78:** 37-44.

Delvallée I. PA, and de Klerk G.-J. (1990) The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. II. The effect of temperature. *Physiol. Plant* **80:** 431-436.

Dhar U, and Upreti J. (1999) *Plant Cell Rep.* **18:** 664-669.

Dilta BS, Pathanian N. S., and Sehgal, O. P. (2000) Studies on scale propagation of hybrid lilies. *Journal of Ornamental Horticulture New Series* **3:** 62-63.

Dobereiner J, Baldani, V. L. D., and Reis, V. M. (1995) Endophytic occurence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. *In* I Fendrik, Del Gallo, M., Vaderleyden, J., and De Zamaroczy, M., ed, In *Azospirillum* VI and related microorganisms. Springer-verlage Publisher, Berlin, pp 3-14.

Dole MJ, and Wilkins, H. F. (1994) Interaction of bulb regeration and shoot period on Nellie White, Easter Lily. *Hort. Science* **29:** 143-145.



Dong Z, Canny, M. J., McCully, M. E., Roboredo, M. R., Cabadilla, C. F., Ortega, E., and Rodés, R. (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. *Plant Physiology* **105:** 1139-1147.

Dong Z, Heydrich, M., Bernard, K., McCully, M. E., (1995) Furthur evidence that the N2-fixing endophyte bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 1843-1846.

Evans DA (1993) Techniques for propagation and breeding. *In* Handbook of Plant Cell Culture, Vol 1. McMillan Publisher, New York, USA.

Famelaer I, Ennik, E, Van Tuyl, J. M., Meijer, H., and Creemers, C. (1996) The establishment of suspension and meristem cultutres for the development of a protoplast regeneration and fusion system in lily. *Acta Horticulturae* **414:** 161-167.

Farsam H, Amanlou, M., Amin, Gh., Chegini, Gh., Salehi, M., and Shafiee, A. (2003) Anatomical and phytochemical study of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss, a rare endemic species in Iran. *Daru* **11:** 164-170.

Feldmaier C (1979) Lilies. *In.* Bt Batsford, London, p 435.

Fernando A, Tombolato, C., Azevedo, C., and Negai, V. (1994)



Effects of auxin treatments on in vivo propagation of *Hippeastrum hybridum* by twin scaling. *hort. Science* **29:** 922.

Galston AWaS, K. R. (1995) Polyamine and endogenous growth regulators. *In* Smith, ed, Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers.

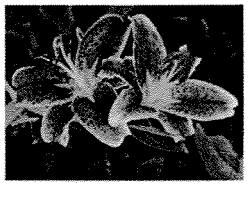
Gasper T (1991) Vitrification in micropropagation. *In* YPS Bajaj, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 17. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 116-126.

Geert JK, and Gerrits, M. M. (1996) Development of Dormancy in Tissue Culture Lily Bulblet and Apple Shoots. *In* Lang, ed, Plant dormancy. CAB International, USA, pp 115-131.

Gerrit JK, Kim, K. S., Schadewijk, M. V., and Gerrits, M. (1992b) Growth of bulblets of *Lilium speciosum in vitro* and in soil. *Acta Horticulturae* **325:** 513-520.

Gerrits ML, De Klerk, G. J. and Croes, A. (2000) How to produce lily bulblets *in vitro* that perform optimally after planting. *Acta Horticulturae* **530:** 289-295.

Gerrits ML, Hol, T., Miller, W., Hardin, B., Croes, A., and De Klerk, G. J. (1997b) Dormancy breaking in bulblets regenerated in vitro: Effect on growth after planting. *Acta Horticulturae* **430:** 429-436.



Gerrits ML, Kipnis, H. L., Croes, T., Miller, W., Kolloffel, C., and Deklerk, G. J. (1997a) Bulb growth in Lilies regenerated *in vitro*. *acta Horticulturae* **430:** 267-273.

Gerrits MM, Kim, K. S., and Deklerk, G. J. (1992a) Hormone control of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae* **325:** 521-527.

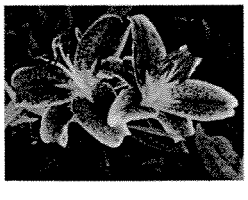
Ghazvini R, F., Varnusfaderani, M. T., Hamidoghli, Y. (2005) Effect of genotype and plant growth regulator on the *in vitro* induction of bulblets from bulb scale segment of *Lilium ledebourii* (Chelcheragh Lily) and *Lilium* Gironde. *Journal of Korean Society for Horticultural Science* **46:** 317-320.

Godo T, Kobayashi, K., Tagami, T., Matsui, K., and Kida, T. (1998) I*n vitro* propagation utilizing suspension cultures of meristematic nodular cell clumps and chromosome stability of *Lilium x formolongi* hort. *Scientia Horticulturae* **72:** 193-202.

Gosal SS, and Grewal H. S. (1991) Tissue culture propagation: problems and potentials. *In* J Prakash, and Pierik, R. L. M., ed, Horticulture New Technologies and Applications. Kluwer Academic Publishers, Bether Lands, pp 197-200.

Grassotti A (1996) Economics and culture techniques of lilium production in Italy. *Acta Horticulturae* **414:** 25-34.

Grassotti A (1997) The effects of scale incubation temperature



treatments on number and growth of regenerated bulblets, to reduce productin of commercial lily bulbs. *Acta Horticulturae* **430:** 221-225.

Grout BWW, and Aston M. J. (1978) Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort. Res.* **17:** 65-71.

Halevey AH (2000) Introduction of native Israeli plants as new cut flowers. *Acta Horticulturae* **541:** 79-82.

Hana BH, Yaea B. W., Yua H. J., and Peak K. Y. (2004) Improvement of in vitro micropropagation of *Lilium oriental hybrid* 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. *Scientia Horticulturae* **103:** 351-359.

Hank G (1991) Chips off the old bulb. *The Garden* **116:** 442-446.

Haque SM, Wada, T., and Hattori, K. (2000) Garlic roots for micropropation through *in vitro* bulblet formation. *Acta Horticulturae* **520:** 45-53.

Harding K, and Roubelakis-Angelakis K.A. (1994) *Vitis* **33:** 247-248.

Harmann RD (1988) The role of the micropropagation business in invention and commercialization of plants. *In* TJ Mabry, ed, Plant Biotechnology. IC2 Institute, Austin, pp 193-203.



Harper PC (1991) Micropropagation of bulb crops. *In* RLM Pierik, and Prakash, J., ed, Horticulture New Technologies and Applications. Kluwer Academic Publishers, Bether Lands, pp 161-168.

Hartman HT, Kester, D. E., Davies, F. T. (1997) Plant propagation: principles and practices, Ed 7 th. Prantice-Hall International Inc, New Jersy, USA.

Hennipman E (2000) Sustainable exploitation in ornamental horticulture, an example: *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Acta Horticulturae* **541:** 67-73.

Higgins WS, Stimart, D.P. (1990) Influence of in vitro generation temperature and post-in vitro cold storage duration on growth response of *Lilium longiflorum* bulblets. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **115:** 930–933.

Hill L, Reimholz, R., Schroder, R., Nielsen, T.H., and Stitt, M. (1996) The onset of sucrose accumulation in cold stored potato tubers is caused by an increased rate of sucrose synthesis and coincides with low levels of hexose phosphates, an activation of sucrose phosphate synthase and the appearance of a new form of amylase. *Plant Cell Environ.* **19:** 1223–1237.

Hu CY, and Wang P.J. (1983). *In* DA Evans, Sharp W.R., Ammirato P.V. and Yamada Y., ed, Handbook of Plant Cell Culture, Ed 1 th. Macmillan Publisher, New York, pp 177-227.



Hurek T, Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M., and Kellenberger, E. (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus sp.* strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology* **176:** 1913-1923.

Hussey G (1976) In vitro release of auxillary shoots from apical dominance in monocotyledonous plantlets. *Annals of Botany* **40:** 1323-1325.

Hussey G (1977) *In vitro* propagation of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Ameryllidaceae. *acta Horticulturae* **78:** 303-309.

Hussey S (1975) Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Ameryllidaceae. *Journal of Experimental Botany* **26:** 253-262.

Ievinsh G. JG, Megre D., Klavina D., and Dapkuniene S. (2003) Physiological reactions of lilies during the cold storage in vitro. *Acta Horticulturae* **616:** 429–431.

Ishioka N, and Tanimoto, S. (1990) Studies on bublet differentiation in bulbscale segments of *Lilium longiflorum*: Effect of wounding and trumatic acid. *Bulletin of the Faculty of the Agriculture, Saga University* **69:** 27-33.

Ishioka N, and Tanimoto, S. (1991) Studies on bublet differentiation in bulbscale segments of Lilium longiflorum: Effect of anaerobic



treatment. *Bulletin of the Faculty of the Agriculture, Saga University* **70:** 67-70.

Ishioka N, and Tanimoto, S. (1993a) Bulblet differentiation in leaf segments of *Lilium longiflorum. Bulletin of the Faculty of the Agriculture, Saga University* **74:** 99-106.

Ishioka N, and Tanimoto, S. (1993b) Changes in proteins during bulblet differentiation in *Lilium longiflorum. Bulletin of the Faculty of the Agriculture, Saga University* **74:** 107-113.

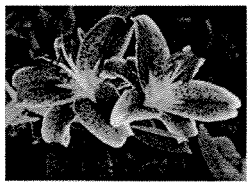
ITC Cut flowers : A study of major markets. *In.* ITC Publication, Genova, p 60.

Jakobsone G, and Andersone, U. (1997) Propagation of Latvian selected lilies in vitro in the National Botanic Garden. *Baltic Botanic Gardens*: 76-83.

Jalili A, and Jamzad, Z. (1999) Red Data book of Iran. *In.* Research Institute of forests and Rangelands, Tehran, Iran, p 748.

James EK, and Olivares, F. L. (1997) Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17:** 77-119.

James EK, and Olivares, F. L. (1998) Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17:** 77-119.



James EK, Olivares, F. L., Baldani, J. I., and Dobereiner, J. (1997) *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L Moench. *Journal of Experimental Botanic* **48:** 785-797.

James EK, Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, J. I., and Dobereiner J. (1994) Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botanic* **45:** 457-466.

Jeong JH (1996) In vitro propagation of bulb scale section of several korean native lilies. *Acta Horticulturae* **414:** 269-276.

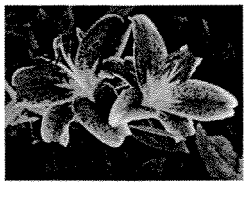
Juntilla O (1988) To be or not to be dormant: some comments on the new dormancy nomenclature. *Hort. Science* **23:** 805-806.

Kaneda M (1990) Lilioside a form of *Lilium longiflorum* synthesis and absolute configuration. *Phytochemistry* **29:** 3556-3564.

Kawa L, and De Hortogh, A. A. (1998) Root physiology of ornamental flowering bulbs. *Horticultural Reviews*.

Khosh-Khui M, and Azadi, P. (2007) Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology* **10:** 582-591.

Kim KW, and De Hortogh, A. A. (1997) Tissue culture of ornamental



flowering bulbs (Geophytes). *Horticultural Reviews* **18:** 87-169.

Kim KW, Byun, J. D., Choi, K. I., Park, E. Y., and Kim, J. S. (1996) Morphological differences related to developmental pattern of lily plantlets regenerated from scales *in vitro*. *Acta Horticulturae* **414:** 263-268.

Komarov VL (1968) Flora USSR. *In*, Vol 1, p 283.

Krikorian AD, and Kann, R. P. (1995) Regeneration in Liliaceae, Iridaceae and Amarylidaceae. *In* IK Vasil, ed, Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol 3. Academic Press, New York, USA, pp 187-205.

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:** 629-632.

Kyte L, and Kleyn J. (2003) The growing room. *In* Plants from Test Tubes. Timber Press, Oregon, USA, pp 102-104.

LANGENS-GERRITS M, KLERK, G., and CROES, A. (2003) Phase change in lily bulblets regenerated in vitro. *Physiologia Plantarum* **119:** 590-597.

Lim S, Seon, J.H., Son, S.H., Han, B.H., and Peak, K.Y. (1998) Effect of explant sources and plant growth regulators on bulblet



formation in Lilium. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **39:** 111–114.

Maesato K, Sharada K., Fukui H., Hara T., Sarma K.S. (1994) In vitro bulblet regulation from bulbscale explants of *Lilium japonicum* Thunb.: effect of plant growth regulators and culture environment. Journal of Horticultural Science **69:** 289–297.

Manreet S, Arora J. S., Singh K., and Gosal S. S. (1998) Studies on In vitro Propagation of Carnation (*Diathus caryophyllus L.*). *Plant Tissue Cult.* **8:** 61-68.

Matsuo E, and Arisumi, K. (1979) Studies on growth and development of bulb in Easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) 6: Effect of the scaling and chilling duration on leaf emergence of scale bulblets. *J Jpn Soc Hortic Sci* **46:** 338-342.

McCully ME (2001) Nitches for bacterial endophytes in crop plants: A plant biologist's view. *Aust. J. Plant Physiol.* **28:** 983-990.

McInroy JA, and Kloepper W. (1995) Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* **173:** 337-342.

Miller WB, Langhans, R.W., (1990) Low temperature alters carbohydrate metabolism in Easter lily bulbs. *HortScience* **25:** 463–465.

Millidge J (1999) Lilies, Ed 1 th. Grange Books, London Rochester, England.



Mimaki Y, Sashida, Y. (1990) Novel phenolic amide derivative from the bulbs of *Lilium regale*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **38:** 541-543.

Mizuguchi S, and Ohkawa M. (1994) Effects of nephthaleneacetic acid and benzyladenine on growth of bulblets regenerated from white callus of mother scale of *Lilium japonicum* Thunb. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* **63:** 429-437.

Moreiera-Dias JM, Molina, R. V., Guardiola, J. L., and Garcia, L. A. (2001) Daylength and photon flux density influence the growth regulators: Effects on morphogenesis in epicotyl segments of *Troyer citrange*. *Scientia Horticulturae* **87:** 275-290.

Murashige T (1977) Clonal crops through tissue culture. *In* W Barz, and Reinhard, E., ed, Plant tissue cultrue and its biotechnological applications. Springer Verlage, Berlin, pp 392-403.

Murashige T (1990) Plant propagation by tissue culture. *In* E Ammirato P.V., D. A., and Bajaj, Y. P. S., ed, Handbook of plant cell culture, Vol 5. Mc Graw Hill, New York, USA, pp 3-9.

Murashige T, and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15:** 473-479.

Mynett K (1996) Research production and breeding of lilies in eastern european countries. *Acta Horticulturae* **414:** 47-53.



Nhut DT (1998) Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudobulblet culture. Plant Cell Rep. **17:** 913-916.

Nielsen TH, Deiting, U., and Stitt, M. (1997) A b-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol.* **113:** 503–510.

Niimi Y (1984) Effect of a-naphthaleneacetic acid and 6-benzylaminopurine on the development of excised-bulbs (*Lilium rubellum* Baker) cultured in vitro both in diffused light and in continuous darkness, and the leaf emergence from the bulbs *in vitro*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* **53:** 59–65.

Niimi Y (1985) Factors affecting the regeneration and growth of bublets in bulbscale cultures of *Lilium rubellum* Baker. *J Jpn Soc Hortic Sci* **54:** 82-86.

Niimi Y (1995) In vitro propagation and post-*in-vitro* establishment of bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. *J Jpn Soc Hortic Sci.* **63:** 843-852.

Niimi Y, Endo, Y., and Arisaka, E. (1988) Effect of chilling and GA3 traetment on breaking of dormancy in *Lilium rubellum* Baker bulblets cultured *in vitro*. *J Jpn Soc Hortic Sci* **57:** 250-257.

Nitzsche W (1983) Germplasm preservastion. *In* WRS D. A Evans, P.V.



Ammirato, and Y. Yamada, ed, Hand book of Plant Cell Culture, Vol 1. Collier Macmillan Publishers, London, pp 782-805.

Noordegraaf V (1998) Trends and requirments in floriculture in Europe. *Acta Horticulturae* **457:** 39-48.

Novak FJ, and Petru, E. (1981) Tissue culture propagation of lilium hybrids. *Scientia Horticulturae* **14:** 191-199.

Ohkawa K (1979) Effects of gibberellins and benzyladenine on dormancy and flowering of *Lilium speciosum. Scientia Horticulturae* **10:** 255-260.

Okazaki K, Koizumi, M., and Nishio, T. (1994) Callus formation and regeneration of some species of lilium. *Acta Horticulturae* **392:** 97-106.

Okubo H, Chijiwa, M., and Uemoto, S. (1988) Seasonal changes in leaf emergence from scale bulblets during scaling and endogenous plant hormone levels in easter lily. *Journal of Faculty of Agricultural Kyushu University* **33:** 9-15.

Palus JA, Borneman J., Ludden P. W., and Triplett E. W. (1996) A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stem of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. Plant Soil **186:** 135-142.

Panizze M, Sodi, A. M., Tognoni, F. (1990) Effect of various factors on in vitro propagation of *Lilium speciosum* Thunb. and *Lilium longiflorum* Thunb. *Advance of Horticulture Science* **10:** 103-106.



Park NB (1996) Effect of temperature, scale position and growth regulators on the bulblet formation and growth during scale propagation of lilium. *Acta Horticulturae* **414:** 257-261.

Paula MA, Siqueira, J. O., and Dobereiner, J. (1993) Occorencia de fungos micorrizicos vesiculoarbusculares e de bacterias diazotroficas na cultura da batata-doce. *Revista Brasileira Ciencia Solo* **17:** 349-356.

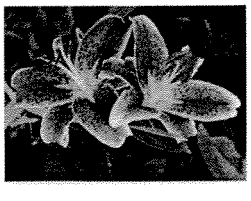
Pelkonen VP, and Kauppi, A. (1999) The effect of light and auxins on regeneration of *Lilium regale* cells by somatic embryogenesis and organogenesis. *International Journal of Plant Science* **160:** 483-490.

Pierik RLM (1997) In vitro culture of higher plants. Dordecht: Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Pierik RLM, and Steegmans, H. H. M. (1975) Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulbscale segments of *hyacinth. Physiol. Plant* **72:** 1-6.

Pollock M, and Griffiths, M. (1998). *In* Shorter dictionary of gardening. McMillan Publishers LTD, Great Britain, p 836.

Precee JE, and Compton M.E. (1991). *In* YPS Bajaj, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation I,



Ed 17 th. Springer, Berlin, pp 169-189.

Priyadarshi S, and Sen, S. (1992) A revised scheme for mass propagation of Easter lily. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **30:** 193-197.

PURVIS ON (1961) The physiological analysis of vernalisation. *In* Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 16, pp 76-122.

PURVIS ON, and GREGORY F.G. (1937) Studies in vernalization of cereals. I. A comparative study of vernalisation in winter rye by low temperature and by short days. *Annals of Botany* **1:** 569-592.

PURVIS ON, and GREGORY F.G. (1952) Studies in vernalisation of cereals. XII. The reversibility by high temperature of the vernalised condition in Petkus winter rye. *Annals of Botany* **16:** 1-21.

Rechinger KH (1990). *In* Flora Iranica. No. 165, p 58.

Rees AR (1992). *In* Ornamental bulbs, corms and tubers. CAB International, Walling Ford, p 220.

Rees T, Dixon, W.L., Pollock, C.J., and Franks, F. (1981) Low temperature sweetening of higher plants. *In* J Friend, Rhodes, M.J.C., ed, Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables. Academic Press, New York, p 41–61.

Rick CM (1984) Plant germplasm resources. *In* PA Ammirato, Evans D.



A., Sharp W. R. , and Yamada Y., ed, Hand book of Plant Cell Culture, Vol 1. Collier Macmillan Publishers, London, pp 9-37.

Robb JM (1957) The culture of excised tissue from from bulb scales of *Lilium speciosum* Thunb. *Journal of Experimental Botanic* **8:** 345-352.

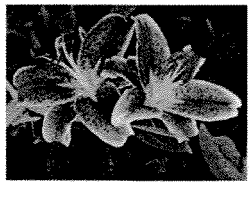
Roh MS (1985) Flowering response of mid-century hybrid lilies to bulb vernalization and shoot photoperiod treatment. *Hort. Science* **20:** 710-713.

Roh MS, and Lawson, R. H. (1992) Propagation and transplant production technology of new floral crops. *In* K Kurata, and Kozai, T., ed, Transplant Production Systems. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 120-147.

Roh MS, and Lawson, R. H. (1993) Progress of new cops research : A cooperative program between the government and industry. *Acta Horticulturae* **33:** 145-151.

Roh MS, and Wilkins H. F. (1977b) The control of flowering in *Lilium longiflorum* Thunb. Cv Nellie White by cyclic or continuous light treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **102:** 247-253.

Roh MS, and Wilkins, H. F. (1977) The physiology of dormancy and maturity of *Lilium longiflorum* Thunb : Dormancy - scale removal and bulb light treatment. *Journal of Korean Society for Horticultural Science* **18:** 101-108.



Roh MS, and Wilkins, H. F. (1977a) Comparison of continuous and alternating bulb temperature treatments on the growth and flowering in *Lilium longiflorum* Thunb. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **102:** 242-247.

Roh SM (1978) Dormancy and maturity in the bulbil of *Lilium lancifolium*. I the influence of low temperature, gibberelic acid and abcisic acid on the sprouting and endogenous growth substrates in the mature bulbil. *Journal of Korean Society for Horticultural Science* **19:** 82-88.

Rosebroeck EJA, Greeff, K. J. M., and Koster, A. T. J. (1987) Effect of temperature and humidity on parameters related to the wound response of lily bulbscale and their role in contorl of penicillium decay in combination with a treatment of Captan. *Mededelingen van de Faculty Landbouwwetens chappen Rijksuniversiteit Gent* **52:** 1305-1310.

Roussos PA, and Pontikis C.A. (2001) *J. Hort. Sc. Biotech.* **76:** 441-446.

Seibert MW (1957) The effect of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiology* **54:** 130-139.

Sekiya J, and Yamada, Y. (1974) Cytokinin regulation of protein synthesis during the early stages of shoot formation in cultured



tobacco cells. *Bulletin Institute of Chemistry Research Kyoto University* **52:** 246-255.

Sevilla M, De Oliveira, A., Baldani, I., and Kennedy, C. (1998) Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study. *Symbiosis* **25:** 181-191.

Sheridan WF (1968) Tissue culture of the monocot Lilium. *Planta* **82:** 189-192.

Shimamura H, Sashida, Y., Mimaki, Y., and Iitak, Y. (1988) Studies on the chemical constituents of *Lilium henryi* Baker. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **36:** 2430-2446.

Shin KS, Chakrabarty D. and Paek K.Y. (2002) Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulblets regenerated in vitro. *scientia Horticulturae* **96:** 195–204.

Simmonds JA, and Cumming, B.G. (1976) Propagation of Lilium hybrids. II. Production of plantlets from bulb scale callus cultures for increased propagation rates. *Scientia Horticulturae* **5:** 161-170.

Singh S, Bahattacharrya, S., Ray, B. K., and Deka, P. C. (1994) *In vitro* propagation of *Citrus reticulatan* Blanco and *Citrus lemon* L. *Hort. Science* **29:** 214-216.



Stanilova MI, Ilcheva, V. P., and Zagorska, N. A. (1994) Morphogenetic potential and *In vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum L.* and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Reports* **13:** 451-453.

Stenberg NE, Chen, C. H., and Ross, J. G. (1997) Regeneration of plantlets from leaf cultures of *Lilium longiflorum* Thunb. *Proceeding South Dakota Academic Sicence* **56:** 152-158.

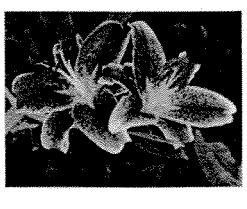
Stimart DP, and Ascher, P.D. (1978) Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *J Am Soc Hortic Sci* **103:** 182-184.

Stimart DP, Ascher, P.D., Wilkins, H.F. (1982) Overcomming dormancy in *Lilium longiflorum* bulblets produced in tissue culture. J. Am. Soc. Hort. Sci. **107:** 1004–1007.

Suh JK, Lee, J. S. (1996) Bulblet formation and dormancy induction as influenced by temperature, growing media and light quality during scaling propagation of lilium species. *Acta Horticulturae* **414:** 251-256.

Sutter E, and Langhans R. W. (1978) Epicutucular wax and cuticular formation in meristem regenerated plantlets of carnation. *Hort. Science* **13:** 348.

Sutter E, and Langhans R. W. (1979) Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J Am Soc*



Hortic Sci **104:** 493-496.

Taji AM, Dodd, W. A., and Williams, R. R. (1997) Plant tissue culture practice, Ed Rd. Armidale : UNE Press, Australia.

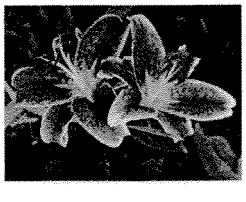
Takayama S, and Misawa, M. (1980) Differentiation in Lilium bulbscales grown in vitro. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiol. Plant* **48:** 121-125.

Takayama S, and Misawa, M. (1982) Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in lilium bulbscales grown *in vitro*. *Plant Cell Physiology* **23:** 67-74.

Tanimoto S, and Ishioka, N. (1991) Studies on differentiation in bulbscale segments of *Lilium longifolium*. V. Isolation and purification of calmodulin. *Bulletin of the Faculty of the Agriculture, Saga University* **71:** 71-79.

Tanimoto S, and Ishioka, N. (1992) Bulblet differentiation in cultured cell *Lilium longiflorum*. *Bulletin of the Faculty of the Agriculture, Saga University* **72:** 91-96.

Tanimoto S, and Matsubara, Y. (1995) The effect of spermine on bulblet formation in bulbscale segments of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Reports* **15:** 297-300.



Tapingkae T, and Taji A. (2000) Light quality and quantity : their effects on in vitro growth and development of two Australian plant species. *Acta Horticulturae* **541:** 281-285.

Thomas P, and Ravindra M.B. (1997) *J. Hort. Sci.* **72:** 713-722.

Thorpe TA, and Harry, I. S. (1996) Appication of tissue culture to horticulture. *Acta Horticulturae* **446:** 39-49.

Toogood A (1999) Propagating plants, Ed 1 th. Great Britain, London.

Torres KC (1989) Tissue culture techniques for horticultural crops, Ed 1 th, New York, USA.

Van Aartrijk J, and Blom-Barnhoorn, G.J. (1981) Growth regulator requirement for adventitious regeneration from lilium bulb scale tissue in vitro, in relation to duration of bulb storage and cultivar. *Scientia Horticulturae* **14:** 261-268.

Van Aartrijk J, Blom-Barnhoorn J. and van der Linde P. C. G. (1990) Lilies. *In* PV Ammirato, Evans D. A., Sharp W. R., Bajaj Y. P. S., ed, Handbook of Plant Cell Culture, Vol 5. McGraw-Hill Publishing Co, New York, pp 535-575.

van Aartrijk J, Blom-Barnhoorn, G.J., and Bruinsma, J. (1985) Adventitious formation from bulbscale explants of *Lilium speciosum* Thunb. *In vitro* production of ethane and ethylene. *Plant Physiology* **117:** 411-422.



Van der Linde PCG (1992) Tissue culture of flower bulb crops : theory and practice. *Acta Horticulturae* **325:** 419-427.

Van Lee B, Nhut, D. T., and Van Thunh, K. T. (1999) Plant production via shoot regeneration fron thin cell layer pseudo-bulblets explants of *Lilium longiflorum in vitro*. *Plant Biology and Pathology* **322:** 303-310.

Villers TA (1975) Dormancy and the survival of plants. *Studies in Biology* **57:** 524-527.

Wardle K, Dalsou V., Simpkins I., and Short K. C. (1983) Redistribution of rubidium in plants of *Chrysanthemum morifolium* Ram. cv. Snowdown derived from tissue culture and transferred to soil. *Annals of Botany* **51:** 261-264.

Wardle K, Quinilan A., and Simpkins I. (1979) Abscisic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* regenerated through apical meristem culture. *Annals of Botany* **43:** 745-752.

Weon KK, Sung, K.J., Young, K.E., Doo, C.J., and Kyeung, P. (1998) Effects of culture condition on dormant status of in vitro regenerated *Lilium Oriental* hybrid bulblets. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **39:** 641–646.

White D (2007) Nitrogen Fixation. *In* The Physiology & Biochemistry of



Prokaryotes, Ed 3rd. Oxford University Press, London.

Wickremesinhe ERM, Holcomb E. J. and Arteca R. N. (1994) A practical method for the production of flowering Easter lilies from callus cultures. *Scientia Horticulturae* **60:** 143-152.

Yae BW, Han, B.H., and Goo, D.H. (2001) Dormancy breaking and in vitro growth of in vitro bulblets in *Lilium Oriental* hybrid Casablanca. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **42:** 99–102.

Yamagishi M (1995) Effects of cold treatment, BA, and GA3 on enlargment and leaf emergence of *in vitro* cultured bublets of *Lilium longiflorum* Thunb. *J Jpn Soc Hortic Sci* **64:** 367-373.

Yamagishi M (1998) Effects of culture temperature on the enlargment, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of in vitro bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. *Scientia Horticulturae* **73:** 239-247.

Yoo ID, Fujii, T., Sano, Y., Komagata, K., Yoneyama, T., Iyama, S., and Hirota, Y. (1986) Dinitrogen fixation of rice-*Klebsiella* associations. *Crop Sci* **26:** 297-301.

Yu D, and Meredith C.P. (1986) *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* **111:** 972-975.



شماره پایان نامه :

تاریخ تصویب :

این پایان نامه در هیأت داوران مرکب از :

۱.

۲.

۳.

۴.

۵.

مطرح و طبق صورت جلسه جداگانه با نمره .....تصویب گردید.

مدیر گروه بیولوژی