

بررسی تأثیر تیمار بنزیل آدنین و فراصوت بر پرآوری درون شیشه‌ای سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Boiss.)

زهرا عظیم‌زاده^{1*}، مهدی محبالدینی²، اسماعیل چمنی³

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی

نویسنده مسئول * : zahra.azim@ymail.com

2- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی

3- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی

چکیده

سوسن چلچراغ کمیاب‌ترین گونه‌ی سوسن است که در حال انقراض می‌باشد و از آنجا که برداشت پیاز از محل رویش طبیعی آن به منظور تکثیر به روش‌های متداول ممکن است به انقراض نسل آن منجر شود، از اینرو استفاده از روش کشت بافت برای تکثیر این گیاه، دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد. بر همین اساس این پژوهش به منظور بررسی تأثیر تیمار بنزیل آدنین و فراصوت بر پرآوری سوسن چلچراغ در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. برای این منظور، ریزنمونه‌های پیاز پس از قرارگیری در حمام فراصوت با فرکانس 35 کیلوهرتز با زمان‌های صفر، 5، 10، 20 و 30 ثانیه، در محیط کشت MS حاوی بنزیل آدنین با غلظت‌های صفر، 0/01، 0/1 و 1 میلی‌گرم بر لیتر کشت گردید. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی و با 4 تکرار صورت گرفت. در این پژوهش اثر متقابل تیمار فراصوت و بنزیل آدنین معنی‌دار نشد. همچنین تیمار بنزیل آدنین تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن کل و وزن پیازچه نداشت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بیشترین تعداد پیازچه و تعداد فلس از تیمار 0/01 میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین بدست آمد. امواج فراصوت بر صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش تأثیر مثبت داشت، بطوریکه در همه‌ی تیمارهای فراصوت، وزن کل و تعداد پیازچه نسبت به شاهد بیشترین مقدار را داشت و بیشترین تعداد و وزن پیازچه از تیمار 30 ثانیه فراصوت حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، تکثیر درون شیشه‌ای، سوسن چلچراغ، فراصوت

مقدمه

سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium ledebourii* Boiss.، گیاهی از تیره‌ی Liliaceae (6) و از دسته سوسن‌های مارتاگون بوده، دارای پیازی تخم مرغ شکل با فلس‌های سرنیزه‌ای است. این گونه دارای ساقه‌ی بلند و قوی به ارتفاع 50-15 سانتی‌متر بوده که در تمام طول سال پوشیده از برگ‌های متراکم ایستاده و در بخش فوقانی تقریباً کم برگ است (1). گلها بطور واژگون قرار داشته و روی حاشیه‌ی گلبرگ‌ها، با لکه‌های برجسته به رنگ قهوه‌ای مزین شده است و دارای پرچم‌های بلند به رنگ قرمز است. هر گل دارای 6 گلبرگ نما و 6 پرچم بوده و گلها دارای عطر تندی هستند (6). با توجه به اینکه این گیاه دارای صفات مهمی از قبیل مقاومت زیاد به سرما و عطر زیاد می‌باشد، از اینرو می‌تواند به عنوان منبع ژنتیکی مهم برای بهبود صفات گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. همچنین این گل دارای پتانسیل بالایی به عنوان یک گل جدید برای عرضه در بازار جهانی می‌باشد. بنابراین برای معرفی و اهلی کردن آن، مراحل مختلفی باید صورت گیرد که یکی از مهمترین این مراحل بررسی روشهای تکثیر می‌باشد. سوسن چلچراغ به دلیل وحشی بودن و تنوع ژنتیکی ناشی از تکثیر جنسی و کارایی پایین روش‌های معمول تکثیر رویشی، همچنین احتمال انقراض آنها در منطقه رویش خود به دلیل برداشت در سطح زیاد جهت تکثیر با روش‌های معمول رویشی، نیازمند تکنیک‌های مناسب تکثیر به روش کشت بافت می‌باشد. در کشت درون شیشه‌ای گیاهان آلی، تنظیم‌کننده‌های رشد مخصوصاً اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها خیلی بارز هستند. سیتوکینین‌ها غالباً برای تحریک رشد و نمو بکار می‌روند. این هورمون‌ها بویژه اگر توأم با یک اکسین اضافه شوند، باعث تحریک تقسیم سلولی می‌شوند (2). سطوح هورمون درون‌زای گیاهی، نقش مهمی را در اندام‌زایی و نمو درون شیشه‌ای گیاه بازی می‌کند و نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که سطوح هورمون درون‌زا می‌تواند با تنش‌های محیطی زیستی و غیرزیستی تنظیم شود (16). یکی از تنش‌های

محیطی غیر زیستی فراصوت می‌باشد. امواج فراصوت، فرکانس‌های صوتی در محدوده‌ی غیر شنیداری برای انسان (معمولاً از 100-20 کیلوهرتز) هستند. در اکثر کاربردهای آن در کشت بافت گیاهی، فراصوت از طریق صوت‌زاهای حمام آب تولید می‌شود (9). اخیراً توجه به اثرات مفید و پتانسیل کاربردهای فراصوت به خصوص در دامنه‌ی شدت کم، در سیستم‌های بیولوژیکی و فرایندهای بیوتکنولوژی افزایش یافته است. اثرات بیولوژیکی فراصوت عمدتاً شامل اثر گرمایی و اثر کاویتاسیون است و به عنوان یک تنش ثانویه روی سلول‌ها و بافتها عمل می‌کند (12).

تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی تاثیر امواج فراصوت به عنوان یک فناوری فیزیکی محرک، بر باززایی سوسن چلچراغ انجام نشده است. در همین راستا در تحقیق حاضر، از امواج فراصوت به عنوان یک محرک فیزیکی و تنظیم‌کننده‌ی بنزیل‌آدنین به عنوان یک محرک شیمیایی جهت پرآوری سوسن چلچراغ در شرایط درون شیشه‌ای استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

برای انجام پژوهش حاضر، سوخهای گل سوسن چلچراغ در تابستان از رویشگاه طبیعی آن در منطقه‌ی خانقاه اردبیل برداشت شده و برای کشت به آزمایشگاه منتقل شد. پس از انجام عملیات ضدعفونی مواد گیاهی، ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار تهیه شده و در محیط کشت MS تکثیر شدند. ریزنمونه‌های پیازی از قسمت‌های وسطی پیازهای رشد یافته در محیط MS تهیه گردید. سپس ریزنمونه‌ها داخل لوله‌های فالكون حاوی آب مقطر استریل ریخته شده و سر آنها با پنبه و درب پلاستیکی و کشیدن سلفون مسدود گردید. برای فراصوت دهی به ریزنمونه‌ها، لوله‌ها در زمان‌های صفر، 5، 10، 20 و 30 ثانیه داخل حمام دستگاه فراصوت قرار گرفتند و سپس برای کشت، به داخل هود لامینار منتقل گردیدند و در محیط کشت MS حاوی تیمار بنزیل‌آدنین با غلظت‌های صفر، 0/01، 0/1، 1 میلی گرم در لیتر کشت شدند. سپس کشتهای انجام شده در اتافک رشد با دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد و تحت 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی قرار داده شدند. 2 ماه پس از کشت، وزن کل گیاهچه، وزن پیازچه، تعداد پیازچه و تعداد فلس، مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی و با 4 تکرار صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل BA و فراصوت بر صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار نبود. همچنین بین زمان‌های مختلف قرارگیری در معرض امواج فراصوت، اختلاف معنی‌داری در سطح 1 درصد وجود داشت (جدول 1). بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها در تیمار فراصوت، مقادیر همه‌ی صفات اندازه‌گیری شده نسبت به شاهد افزایش داشت. با افزایش مدت فراصوت تعداد پیازچه و تعداد فلس افزایش یافت. بیشترین وزن پیازچه از تیمار 30 ثانیه فراصوت حاصل شد (جدول 2). نقش مثبت امواج فراصوت را می‌توان به تأثیر آن بر هورمون‌های درون‌زا و افزایش فعالیت آنزیم‌ها نسبت داد (16).

جدول 1- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای فراصوت و بنزیل‌آدنین بر صفات مورفولوژیکی سوسن چلچراغ

میانگین مربعات					
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن کل (gr)	وزن پیازچه (gr)	تعداد پیازچه	تعداد فلس
BA	3	0/023 ^{ns}	0/009 ^{ns}	3/412 ^{**}	8/33 ^{**}
Ultrasound	4	0/054 ^{**}	0/046 ^{**}	1/635 ^{**}	8/02 ^{**}
B*U	12	0/014 ^{ns}	0/007 ^{ns}	0/323 ^{ns}	1/124 ^{ns}
خطا	60	0/01	0/009	0/265	0/779
ضریب تغییرات		10/84	10/84	27/12	25/82

ns و * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد و معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد

جدول 2- مقایسه میانگین تأثیر تیمار فراصوت بر صفات مورفولوژیکی سوسن چلچراغ

تعداد فلس	تعداد پیازچه	وزن پیازچه (gr)	وزن کل (gr)	مدت فراصوت (s)
4.62 ^b	1.44 ^c	0.14 ^c	0.212 ^b	0
11.31 ^a	3.12 ^{ab}	0.245 ^{bc}	0.34 ^{ab}	5
15.19 ^a	4.31 ^a	0.338 ^{ab}	0.454 ^a	10
15.67 ^a	4.33 ^a	0.326 ^{ab}	0.421 ^a	20
17.44 ^a	4.88 ^a	0.377 ^a	0.422 ^a	30

میانگین های دارای حرف مشترک، از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (در سطح 5%).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر صفات وزن کل و وزن پیازچه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول 1). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین تعداد پیازچه و تعداد فلس از تیمار 0/01 میلی‌گرم بر لیتر BA بدست آمد (جدول 3).

جدول 3- مقایسه میانگین تأثیر تیمار بنزیل‌آدنین بر صفات مورفولوژیکی سوسن چلچراغ

غلظت های BA (mg l ⁻¹)	تعداد پیازچه	تعداد فلس
0	3.5 ^b	11.9 ^{bc}
0.01	5.75 ^a	18.15 ^a
0.1	3.5 ^b	13.95 ^{ab}
1	1.58 ^c	6.95 ^c

میانگین های دارای حرف مشترک، از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (در سطح 5%).

برخی محققین تأثیر تحریکی کمی را در اثر کاربرد سیتوکینین‌ها در تولید پیازچه‌های سوسن یافته‌اند و برخی بطور موفقیت‌آمیزی کاربرد غلظت بالای BA را در نسبتی از اکسین در قابلیت تولید سوسن‌ها گزارش کرده‌اند. در آزمایش‌های انجام گرفته روی *Lilium oriental hybrid* گزارش شد که بیشترین وزن تر و تعداد پیازچه از فلس‌های کشت شده در محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA بدون تنظیم‌کننده‌ی BA بدست آمد (11). در سوسن چلچراغ محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط کشت حاوی 0/01 میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین تعداد سوخک را تولید کردند. بیشترین وزن سوخک از محیط کشت دارای 0/01 میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BA بدست آمد (4). در پژوهشی که روی *L. rubellum Baker* انجام شده بود، اضافه کردن BA همراه با NAA به ندرت تعداد پیازچه را تحت تأثیر قرار داد، به جز در ترکیبی از 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA با 0/01 میلی‌گرم در لیتر BA، همچنین بیشترین وزن تر پیازچه‌ها از تیمار 1 میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با 0/1 میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد (14). در پژوهشی که روی سوسن چلچراغ انجام شد، سطوح مختلف BAP بر تعدادی از صفات اندازه‌گیری شده از قبیل تعداد پیازچه اثر منفی داشت. بیشترین تعداد پیازچه، درصد باززایی از تیمار شاهد و حداکثر وزن پیازچه از تیمار 0/1 میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد (7). در *L. amabile* بهترین نتیجه در تیمار هورمونی 0/01 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/01 میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد و تنظیم‌کننده‌های رشد در غلظت بالا نمو سوخک را مهار کرد، ولی تشکیل سوخک افزایش یافت (10). در پژوهشی که به منظور ارزیابی قابلیت باززایی پیازچه از ریزفلس‌های پیازچه در شرایط درون‌شیشه‌ای و تأثیر BA و NAA در باززایی سوخک سوسن چلچراغ انجام شد، بیشترین تعداد پیازچه در غلظت 0/01 میلی‌گرم در لیتر BA و 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد (3). این گزارش‌ها با نتایج حاصل از پژوهش حاضر تا حدودی همخوانی داشت.

نتایج آزمایش دیگری که روی کشت فلس *L. concolor var. Partheneion* انجام شد نشان داد که بهترین نتیجه در تشکیل سوخک در محیط کشت حاوی 0/01 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/1 میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد (10). دورگ آسیایی بیشترین

تعداد و وزن سوخک را در محیط دارای 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/1 میلی‌گرم در لیتر BA تولید کرد (4). همچنین در آزمایشی که روی *L. longiflorum* انجام شد، بیشترین باززایی سوخک و سنگینترین سوخکها در محیط کشت MS حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر BA همراه با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد (13). در پژوهشی که بر باززایی گیاه از فلس‌های کشت شدهی *L. leucanthum* در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شده بود، بیشترین باززایی و بیشترین میانگین تعداد سوخک در هر فلس در محیط کشت MS حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر BA و 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد (15). در پژوهش دیگری، از کشت فلس سوخ سوسن چلچراغ برداشت شده در زمستان در محیط کشت MS حاوی 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/1 میلی‌گرم در لیتر BA، بیشترین وزن تر سوخکها بدست آمد (8). نتایج حاصل آزمایشی که بر روی *L. longiflorum* انجام شد نشان داد که در محیط کشت MS، با افزایش غلظت BA تا 2 میلی‌گرم در لیتر، تعداد پیازچه‌های تولید شده افزایش پیدا کرد (5). نتایج پژوهش حاضر با گزارش‌های ذکر شده مطابقت نداشت که دلیل این امر ممکن است نوع ریزنمونه، محل جمع‌آوری گیاه و یا امواج صوتی بکار برده شده در این آزمایش باشد، زیرا این عوامل نیز می‌توانند بر میزان هورمون‌های درون‌زا تأثیرگذار باشند (4 و 16).

منابع

- 1- اکرامی، ت. 1359. گیاهان پیازی زینتی. انتشارات دانشگاه تهران.
- 2- باقری، ع. صفاری، م. 1386. مبانی کشت بافتهای گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- 3- پاداشت دهکائی، م.، خلیقی، ا.، نادری، ر.، موسوی، ا. 1387. تاثیر غلظتهای مختلف بنزیل‌آدنین و نفتالین‌استیک‌اسید بر باززایی سوخک در سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*) با استفاده از ریزفلس‌های سوخک. مجله‌ی نهال و بذر، 24(2): 321-331.
- 4- تاتاری ورنوسفادرائی، م.، فتوحی قزوینی، ر.، حمیداوغلی، ی.، حاتم‌زاده، ع. 1386. اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه در کشت درون‌شیشه‌ای فلس‌های سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Bioss.). مجله‌ی علوم کشاورزی ایران، 38(2): 284-276.
- 5- چمنی، ا.، ایزدی، ن.، مشایخی، ک.، ترابی گیگلو، م. 1388. تاثیر بنزیل‌آدنین و ایندول استیک اسید بر تولید فلس گل سوسن در شرایط درون‌شیشه‌ای. مجله‌ی دانش کشاورزی تبریز، 20(1): 169-177.
- 6- قاسمی قهساره، م.، کافی، م. 1390. گلکاری علمی و عملی، جلد اول. انتشارات مولف.
- 7- معمار مشرفی، م.، معینی، ا.، توسلیان، ا. 1381. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، BAP، ریزنمونه موقعیت‌های مختلف فلس و دوره‌ی نوری بر کشت بافت گل سوسن چلچراغ. مجله‌ی علوم زراعی ایران، 4(4): 253-261.
- 8- Azadi, P., Khosh-Khui, M. 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)4: 582-591.
- 9- Gaba, V., Kathiravan, K., Amutha, S., Singer, S., Xiaodi, X., Ananthakrishnan, G. 2006. The uses of ultrasound in plant tissue culture. *Plant Tissue Culture Engineering*, 417-426.
- 10- Jeong, J.H. 1996. *In-vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. *Acta Horticulturae*, (414): 269-276.
- 11- Kumar, S., Awasthi, V., Kanwar. J.K. 2007. Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *in vitro* bulblet formation and growth in oriental lily. *Hort. Sci.* 34(2): 77- 83.
- 12- Liu, Y., Takatsuki, H., Yoshikoshi, A., Wang, B., Sakanishi, A. 2003. Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H⁺-ATPase activity of *Aloe arborescens* callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32: 105-116.
- 13- Mir, j. Ahmed, N., Itoo, H., Sheikh, M.A., Rashid, R., Wani, S. 2012. *In-vitro* propagation of *Lilium longiflorum*. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 82(5): 455-558.
- 14- Niimi, Y. 1985. Factors affecting the regeneration and growth of bulblets in bulb-scale cultures of *Lilium rubellum* Baker. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 54(1): 82-86.



- 15- Tang, Y.P., Liu, X.W., Gituru, R.W., Chen, L.Q. 2010. Callus induction and plant regeneration from *in-vitro* cultured leaves, petioles and scales of *Lilium leucanthum* (Baker) Baker. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(4): 2071-2076.
- 16- Wei, M., Yang, C., Wei, S. 2012. Enhancement of the differentiation of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* to shoots by ultrasound treatment. *Journal of Plant Physiology*, 169: 770-774.