دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2018.109985.1248
جلد ۲۶، شماره ۱، صفحه ۸۳-۷۱ (۱۳۹۷)

باززایی گیاه در معرض انقراض لاله واژگون (*Fritillaria raddeana*) از طریق ریزنمونه‌های گلبرگ و برگ

سلاله صلاحی‌صدر[۱]، هدایت زکی‌زاده[۲*]، محمدرضا نقوی[۳] و جمالعلی الفتی[۴]

۱- دانشجوی دکترای مهندسی علوم باغبانی (گیاهان زینتی)، دانشکده علوم کشاورزی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت. پست الکترونیک: Zakizadeh@guilan.ac.ir

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۸

چکیده

لاله واژگون (*Fritillaria raddeana*)، یکی از منحصر به‌فردترین و زیباترین گیاهان خودرو و بومی ایران است. این جنس از خانواده سوسن به‌شدت در معرض انقراض قرار دارد. گونه *Fritillaria raddeana* مقاوم به خشکی، مناطق سنگلاخی و شیب‌دار می‌باشد و به‌دلیل مطالعات محدود در این گونه، انجام هر گونه پژوهش در این گیاه اهمیت به‌سزایی دارد. با وجود احتمال وقوع جهش، باززایی موفقیت‌آمیز پیش‌نیاز کلیه مطالعاتی است که باید در گونه‌های رو به انقراض انجام شود. این پژوهش کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم را از کشت اندام‌های گلبرگ و برگ *F. raddeana* در محیط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار داد. ریزنمونه‌های برگ پیش از گلدهی و ریزنمونه‌های گلبرگ در حالت غنچه (سبز تا زرد) برداشت شد و پس از ضدعفونی، در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ همراه با غلظت‌های مختلف از اکسین و سایتوکینین کشت شدند. ریزنمونه‌ها برای القای کالوس ابتدا در تاریکی و دمای ۱۸ °C و بعد به روشنایی با شرایط دمایی قبل انتقال یافتند. پس از واکشتِ کالوس‌ها در محیط‌های باززایی، دما به ۲۰ °C افزایش یافت. اگرچه هر دو نوع ریزنمونه به‌دلیل عدم آسیب به گیاهان مادری، درصد نسبتا پایین آلودگی داخلی، تعداد و اندازه مناسب، ریزنمونه‌های قابل قبولی بودند، با این‌حال ریزنمونه گلبرگ دارای پاسخ‌دهی بهتر و سریع‌تر به انواع ترکیبات تنظیم‌کننده رشد بود. بهترین محیط کشت کالوس‌زایی (۸۲/۶۶٪) و باززایی غیرمستقیم (۳۶/۶۶٪) از ریزنمونه‌های گلبرگ، محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون تشخیص داده‌شد که نشان‌دهنده برتری این دو نوع تنظیم‌کننده در باززایی غیرمستقیم *F. raddeana* بود.

واژه‌های کلیدی: باززایی غیرمستقیم، تنظیم‌کننده رشد، کالوس‌زایی، گونه‌های وحشی، گیاه بومی.

مقدمه

لاله واژگون با نام علمی *Fritillaria raddeana*، از گیاهان زیرگروه تک‌لپه‌ای‌ها، در راسته سوسن (Liliflorae) و یکی از ۲۲۰ جنس موجود در تیره سوسن‌یان (Liliaceae) می‌باشد. گیاه لاله واژگون گونه *Fritillaria raddeana* Regel با نام مرسوم لاله واژگون زرد یا لاله گرگانی، گیاهی چند ساله و .....؟ است و در بین ۱۷ گونه لاله واژگون شناسایی شده در ایران یکی از زیباترین گونه‌هاست که در گرگان، خراسان

شمالی و به‌صورت پراکنده در مازندران و غرب کشور یافت می‌شود (Rachinger, 1990) و از لحاظ ظاهری بسیار شبیه گونه کاملا شناخته شده *F. imperialis* است؛ رنگ آن زرد لیمویی و یا زرد کمرنگ و دارای ارتفاع کمتر بوده و نسبت به گونه *F. imperialis* برای رشد و نمو به اقلیم خشک‌تری نیاز دارد. همچنین فاقد بوی نامطبوعی است که در بیشتر گونه‌های این جنس وجود دارد. ازدیاد در این گونه از طریق سوخ و بذر است و سرعت ازدیاد طبیعی آن بسیار پایین است. به‌دلیل محدود بودن سلول‌های مریستمی درصد ازدیاد با روش‌های سنتی فلس‌برداری یا تقسیم سوخ نیز بسیار کم می‌باشد. در ازدیاد از طریق بذر از زمان کشت تا گلدهی پنج تا هفت سال زمان می‌برد، علاوه بر این به‌دلیل دگرگرده‌افشانی گیاهان حاصل از بذر، شبیه به والدین نخواهند بود. گلدهی با توجه به آب و هوا، در فصل بهار و تقریبا تا زمان بارش‌های فصلی ادامه دارد (Le Nard & De Hertogh, 1993).

با وجود ارزش زینتی و دارویی این گونه، به‌ندرت از آن به‌عنوان یک گیاه زینتی و یا یک گیاه دارویی استفاده شده‌است. از آنجا که گونه‌های *Fritillaria* بومی ایران بسیار شاخص و در سطح دنیا کمیاب است، تحقیقات در مورد بهینه‌سازی کشت و کار و تولید این گیاه بسیار مهم است. مدیریت صحیح منابع ژنتیکی در این گونه، ضمن حفاظت از ذخایر ژنتیکی، منجر به استفاده از آن در برنامه-های اصلاحی و ارائه محصولی جدید در سطح جهانی خواهد شد که این امر یکی از رموز موفقیت در گلکاری نوین در جهان می‌باشد. تکثیر درون شیشه‌ای این گونه گیاهان که از راه‌های سنتی نیز با محدویت در ازدیاد مواجه هستند مزایای قابل توجهی دارد. این گونه‌ها به علت برداشت گل و پیاز توسط گردشگران و چرای دام‌ها در رویشگاه‌های طبیعی و همچنین انواع آلودگی‌های درون‌زاد، از لحاظ اقلیم نیز دچار تهدید شده‌اند (Gharehyazie *et al*., 2006). این روش که از مؤلفه‌های ضروری در مدیریت منابع ژنتیک گیاهیست، در حفاظت از گونه‌های نادر و در معرض خطر نقش مهمی را ایفا می‌کند.

با توجه به مطالب ذکرشده، مطالعات ریزازدیادی در گونه *F. raddeana* از اهمیت بالایی برخوردار است. هرچند در این قبیل آزمایش‌ها با توجه به نحوه ازدیاد احتمال بروز جهش و ایجاد تنوع وجود دارد، با این‌حال ضرورت انجام آنها برای جلوگیری از انقراض گونه‌های گیاهی ثابت شده است. در مراحل آینده مطالعات نیز گزینش گیاهان جهش نیافته و یا گیاهانی با ویژگی‌های برتر در دستور کار قرار دارد. این تنوع اساس کارهای به‌نژادی و بیوتکنولوژی و فراهم آورنده مواد اولیه در حفظ و بهبود یک رقم گیاهی است و احتمال انتخاب مواد گیاهی مناسب‌تری را در اختیار به‌نژادگر قرار می‌دهد. علاوه بر تنوع ژنتیکی و ژنوتیپ مورد بررسی، مرحله رشد و نمو گیاه مادری، محل برداشت ریزنمونه، محیط کشت پایه، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط قرارگیری نمونه در اتاقک رشد نیز در نتایج به‌دست آمده از این گونه آزمایش‌ها مؤثر است (Sun and Wang, 1991).

فلس سوخ از مرسوم‌ترین ریزنمونه‌های کشت بافت لاله‌های واژگون است اما اغلب با آلودگی داخلی و خارجی قارچی و باکتریایی بسیار بالایی مواجه است. علاوه بر این، نمونه‌برداری از سوخ باعث از بین رفتن گیاهان مادری این قبیل گونه‌های در معرض خطر می‌شود. البته استفاده از گل به‌طور کامل و گلبرگ و برگ برای باززایی در برخی گیاهان آزمایش شده‌است (Nugent *et al*., 1991; Wu *et al*., 2008). در پژوهش‌هایی در رابطه با جنین‌زایی غیرمستقیم در *F. imperialis* (Mohammadi Deh-cheshmeh, *et al*., 2007) و در باززایی *F. melegaris* (Muraseva *et al*., 2015) گلبرگ بهترین ریزنمونه تشخیص داده‌شد و محیط کشت B5 (Gamborg *et al*., 1968) مناسب‌ترین محیط عنوان شد. در آزمایش دیگری باززایی از ریزنمونه-های متفاوت شاخساره *F. imperialis* بررسی شد و با وجود از بین رفتن درصد بالایی از ریزنمونه‌ها، سریع‌ترین و مؤثرترین باززایی از ریزنمونه‌های برگ به‌دست آمد (Witomska & Lukaszewska, 1997). در گزارشی در گونه *F. thunbergii* (Sun & Wang, 1991) از قطعات برگ‌های جوان، در محیط کشت پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) برای سوخک‌زایی استفاده شد؛ همچنین در

F. melegaris از برگ برای جنین‌زایی سوماتیکی در محیط MS استفاده شد (Subotić *et al.*, 2010).

با وجود ارزش زینتی و دارویی *F. raddeana*، هیچ‌گونه آزمایش درون شیشه‌ای موفقیت‌آمیزی از این گونه در منابع به ثبت نرسیده‌است. بنابراین به‌نظر می‌رسد این موضوع به‌دلیل آلودگی بسیار بالا یا پراکنش بسیار محدود آن در طبیعت باشد، علاوه بر این دسترسی به این مناطق جغرافیایی به دلیل صخره-های سنگلاخ با شیب تند بسیار مشکل است. در این پژوهش به‌عنوان نخستین آزمایش ریزازدیادی از ریزنمونه‌های گلبرگ و برگ *F. raddeana*، از ترکیب‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شد تا دستورالعملی برای حفظ و تکثیر درون شیشه‌ای این گونه بومی و انحصاری رو به انقراض – بدون تخریب گیاه مادری– تهیه شود. این دستورالعمل می‌تواند زمینه‌ای را در راستای ازدیاد و بهره‌برداری از این گیاه و استخراج مواد مؤثره آن، در صنعت دارویی کشور فراهم آورد و یا مقدمات کشت آن را به‌عنوان یک گیاه زینتی مقاوم در فضای سبز شهری ایجاد نماید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: سوخ‌های تولیدی از گونه *F. raddeana* از رویشگاه‌های طبیعی در استان خراسان شمالی (صخره‌ها و تپه‌های سنگلاخی مسیر شاهرود به سمت آزادشهر جمع-آوری شدند و پس از شستشو با آب و مایع شوینده و تیمار با قارچکش (کاربندازیم ۰/۵٪ + بنومیل ۰/۵٪، یک ساعت)، به‌مدت ۴۸ ساعت در معرض هوای آزاد قرار گرفتند. سپس درون پاکت کاغذی به مدت چهار تا هشت هفته در دمای ۴°C برای غلبه بر رکود نگه‌داری شدند.

آماده‌سازی ریزنمونه‌ها

الف: آماده‌سازی ریزنمونه برگ:

سوخ‌ها در گلخانه مشابه با شرایط رشد طبیعی گیاه کشت شدند. پس از حدود سه ماه و پیش از ورود به مرحله زایشی تعدادی از برگ‌ها برداشت شد و درون آب حاوی دو قطره توین ۲۰ به مدت پنج دقیقه بر روی شیکر غوطه‌ور شده و پس از آن به مدت نیم ساعت در زیر آب جاری قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها به درون بطری سترون انتقال یافت، سطح خارجی بطری با الکل ۹۶ درصد ضدعفونی و به زیر هود لامینار منتقل گردید. سپس ریزنمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ فروبرده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط محلول سدیم هیپوکلریت حاوی ۱/۵ درصد کلر فعال (ضدعفونی‌کننده با نام تجاری دامستوس) به مدت ۱۲ دقیقه ضدعفونی شدند. نمونه‌های سترون شده با آب مقطر دو بار سترون، سه بار به مدت سه، پنج و هفت دقیقه آبکشی شدند. برگ‌ها با قیچی و تیغ اسکالپل سترون به قطعاتی با اندازه یک سانتی‌متر مربع تقسیم و در محیط کشت‌های پایه MS محتوای ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز که حاوی تنظیم‌کننده-های رشد اکسین (ایندول بوتیریک اسید (IBA)، نفتالن استیک اسید (NAA) و ۲ و۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)) و سایتوکینین‌های بنزیل‌آدنین (BA)، کاینتین (KIN) و تیدیازورون (TDZ) هریک در غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با هم بودند (جدولهای ۲ و ۳)، کشت شد. هنگام آماده‌سازی محیط‌های کشت، اسیدیته روی ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر فیتاژل (Duchefa, The Netherland) به محیط اضافه شد. پس از کشت ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار، درب ظروف کشت (شیشه مربا) برای جلوگیری از نفوذ آلودگی خارجی و پراکنش اسپور قارچ در آلودگی داخلی، ابتدا با پارافیلم و بعد با سلفون پوشیده و برای ۱۵ روز در تاریکی و دمای ۱۸ ±۲°C قرار داده شدند. ظروف کشت هر روز بازبینی شده و در صورت بروز آلودگی حذف شدند. همزمان با القای کالوس و تورم آن، ظروف به اتاق رشد دیگری با شدت نور $۲۰\mu molm^{-2}S^{-1}$ و دمای ۱۸ ±۲°C انتقال یافتند. در ادامه آزمایش، برای انجام مرحله باززایی، کالوس‌ها در زیر لامینار از ظروف کشت خارج و با ترازوی دقیق (ضدعفونی شده با اشعه UV و الکل) توزین شدند. برای این کار از کاغذ صافی‌های اتوکلاو شده استفاده شد. در این مرحله، کالوس‌های دارای وزن تر بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم انتخاب شده و به‌محیط‌های باززایی

شامل ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشدIBA, NAA, 2,4-D KIN, BA, و TDZ در غلظت‌های مشابه آزمایش کالوس-زایی (جدولهای ۱ و ۲) در شدت نور$۲۰\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ و دمای $۲۰ \pm ۲^{\circ}C$ انتقال یافتند.

ب: آماده‌سازی ریزنمونه گلبرگ:

تعداد کمی از سوخ‌های رشد کرده درون گلخانه با توجه به اندازه و شرایط سوخ، پس از گذشت ۲ تا ۳ ماه به مرحله گلدهی رسیدند. غنچه‌های گل در مراحل متفاوت از سبز تا زرد در حالت بسته برداشت شد و پس از شستشو درون آب حاوی دو قطره توییین ۲۰، به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در زیر آب جاری قرار داده شدند و همانند ریزنمونه‌های برگ، پس از انتقال به بطری سترون در زیر هود لامینار، برای ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد فروبرده شدند. غنچه‌های گل توسط محلول سدیم هیپوکلریت حاوی ۱ درصد کلر فعال (ضدعفونی‌کننده با نام تجاری دامستوس) به مدت ۱۲ دقیقه ضدعفونی گردیدند. این نمونه‌ها با آب مقطر دو بار سترون، به روش قبل آبکشی شدند. غنچه‌های گل با تیغ اسکالپل سترون برش داده شدند و گلبرگ‌ها به‌عنوان مواد آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند. هر گلبرگ به دو نیم تقسیم و به‌صورت افقی در محیط‌های کشت با ترکیبات همانند آزمایش قبل قرار گرفتند. سایر مراحل نیز مشابه آزمایش ریزنمونه برگ تکرار شد.

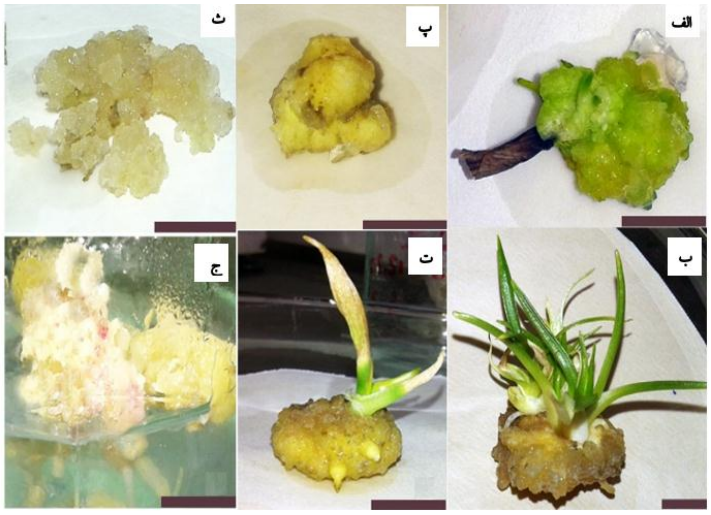
جمع‌آوری داده‌ها و محاسبات آماری:

ظروف کشت ریزنمونه‌های گلبرگ و برگ که با پارافیلم و سلفون عایق‌بندی شده بودند، به‌مدت ۱۵ روز در تاریکی و ۱۵ روز در روشنایی قرار گرفتند. پس از سپری‌شدن این دوره یک ماهه، درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها با تقسیم تعداد ریزنمونه‌های زنده‌مانده به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده به‌دست آمد. درصد تشکیل کالوس نیز ۶۰ روز پس از کشت اولیه، با تقسیم تعداد ریزنمونه‌های کالوس داده به تعداد ریزنمونه‌های زنده‌مانده ارزیابی شد. حدود سه ماه پس از کشت اولیه (واکشت هر سه هفته یکبار)، وزن تر کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. پس از گذشت حدود دو ماه از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط باززایی، درصد باززایی از تقسیم ریزنمونه‌های باززایی شده بر ریزنمونه‌های کالوس‌داده به‌دست آمد. آزمایش برای هر دو نوع ریزنمونه (گلبرگ و برگ) با ۱۰۰ تیمار انجام گردید. این تیمارها شامل هریک از تنظیم‌کننده‌های رشد به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر (ترکیب یک نوع اکسین و یک نوع سایتوکینین) و شاهد بود که در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار (چهار ظرف کشت) و سه عدد ریزنمونه در هر تکرار انجام شد و میانگین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. این آزمایش دو بار تکرار شد و از میانگین داده‌های حاصل برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS استفاده شد. در محاسبات آماری تعدادی از محیط‌های کشت به‌دلیل عدم پاسخ‌دهی مناسب ریزنمونه به تنظیم‌کننده‌های رشد حذف شدند.

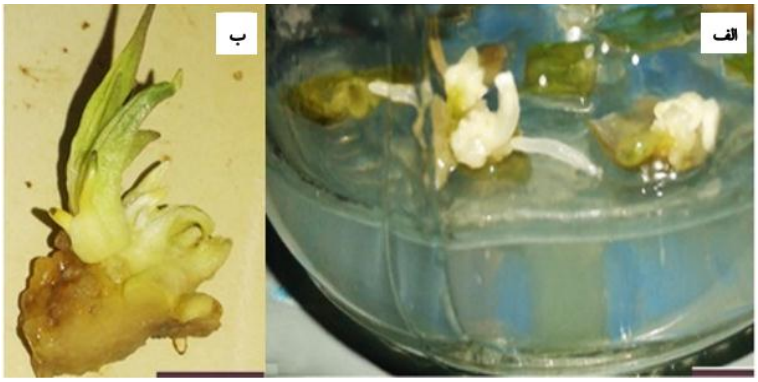
نتایج

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف یک ریزنمونه و میان میانگین داده‌های ریزنمونه گلبرگ و برگ در تمام مراحل آزمایش وجود داشت. میانگین بقای کل ریزنمونه برگ در ۱۰۰ تیمار مورد بررسی در این آزمایش تنها ۰/۴ درصد بود، درحالی‌که در مورد بقای گلبرگ این عدد ۶/۷۹ درصد بود. بهترین محیط کشت با بالاترین درصد زنده‌مانی در هر دو نوع ریزنمونه برگ (۷/۳۳ درصد) و گلبرگ (۸۳ درصد) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. در ادامه مراحل آزمایش نیز محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، بهترین تیمار کالوس‌زایی گلبرگ (۸۲/۶۶ درصد) با بالاترین وزن تر کالوس (۹۷/۸۰ میلی‌گرم) بود. کالوس‌های حاصل از ترکیب این نوع تنظیم‌کننده‌های رشد دارای رنگ سبز براق و شاداب بودند و تعداد گیاهچه‌های باززایی شده (۳۶/۶۶ درصد) نیز نسبت به سایر محیط‌ها بیشتر بود (شکل ۱). همچنین همان‌گونه که در شکل ۱–الف نیز تا حدودی مشخص است کالوس‌دهی در گلبرگ *F. raddeana*،

فقط در محل اتصال گلبرگ به نهنج انجام شد. هرچند در محیط حاوی انواع اکسین به‌همراه سایتوکینین‌های BA و KIN نیز کالوس‌دهی دیده‌شد، با این حال این کالوس‌ها بسیار ضعیف بوده و در صورت باززایی نیز در مراحل بعد اکثرا از بین رفتند. بیشتر کالوس‌های تشکیل‌شده در محیط حاوی 2,4-D بعد از مدتی سیاه و شکننده شده و از بین رفتند. اما بهترین محیط کالوس‌زایی برگ (۳/۳۳ درصد) تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. این کالوس‌ها برخلاف کالوس‌های حاصل از ریزنمونه گلبرگ، دارای رنگ شیری- کرم، کدر و متراکم بودند (شکل ۲).

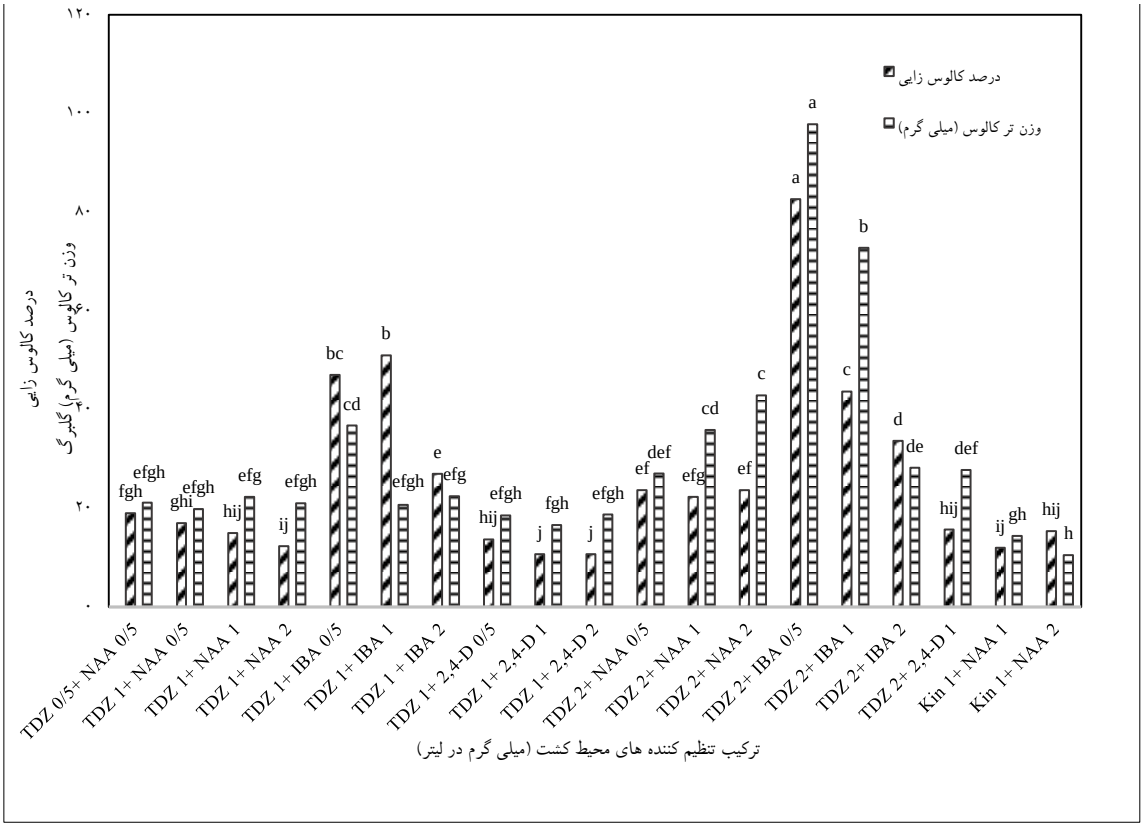


شکل ۱- تشکیل کالوس و باززایی از ریزنمونه گلبرگ ***Fritillaria raddeana*** در محیط موراشیک و اسکوگ (**MS**) با ترکیبات تنظیم‌کننده رشد مختلف (**bar = 1cm**): الف و ب: تشکیل کالوس و باززایی در محیط **MS** حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (**TDZ**) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (**IBA**)؛ پ و ت: تشکیل کالوس و باززایی در محیط **MS** حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (**BA**) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر **IBA**؛ ث و ج: تشکیل کالوس و رشد بیشتر کالوس در محیط **MS** حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین (**KIN**) و ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲ و ۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید (**2,4-D**).



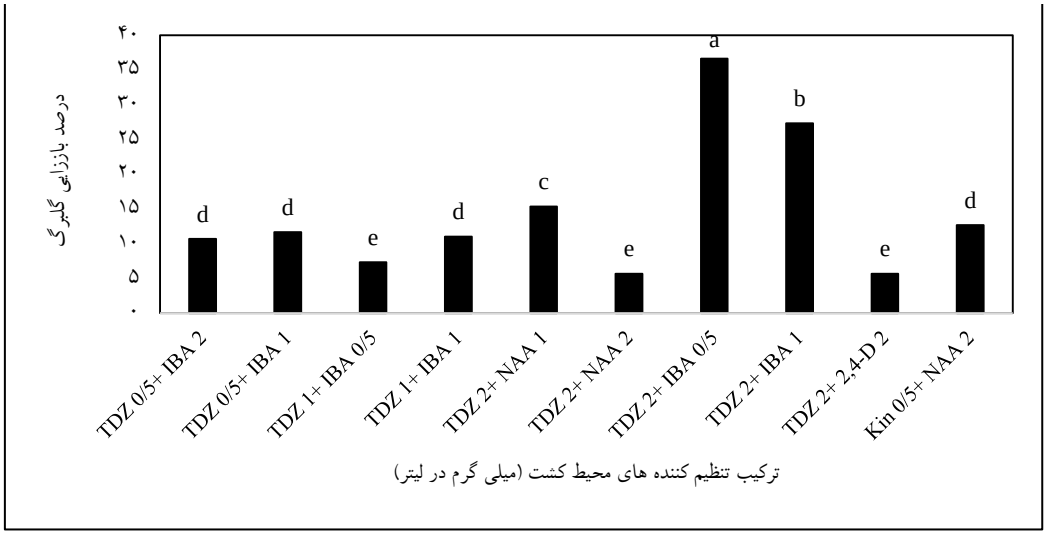
شکل ۲- تشکیل کالوس و باززایی در ریزنمونه برگ ***Fritillaria raddeana*** در محیط موراشیک و اسکوگ (**MS**) با ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (**bar = 1cm**): الف - تشکیل کالوس از برگ در محیط **MS** حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (**BA**) و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (**NAA**)؛ ب- باززایی غیرمستقیم از برگ در محیط **MS** حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر **BA** و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (**IBA**).

جدول‌های ۱ تا ۴ تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم-کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی از گلبرگ و برگ و شکل-های ۳ تا ۵ مقایسه اثرات این مواد را بر ریزنمونه‌ها نشان می‌دهند. با توجه به اینکه ریزنمونه‌های شاهد در کلیه تیمارها همگی پیش از تشکیل کالوس از بین رفتند؛ می‌توان نتیجه گرفت که حضور تنظیم‌کننده‌های رشد برای بقای ریزنمونه‌ها در محیط رشد الزامیست. همچنین در هیچ‌یک از ریزنمونه‌ها و در مراحل مختلف پژوهش، به-کارگیری تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین به تنهایی، در هیچ غلظتی اثری در زنده‌مانی، القای کالوس و باززایی نداشت. بررسی نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها و مقایسات میانگین در ریزنمونه‌های گلبرگ و برگ در کلیه مراحل آزمایش نیز بیانگر برتری ریزنمونه گلبرگ نسبت به برگ بود.



شکل ۳- تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر کالوس‌زایی و وزن تر کالوس ریزنمونه‌های گلبرگ در *Fritillaria raddeana*

میانگین‌های کمتر از ۱۰ درصد حذف شده‌است. مقایسه میانگین بر اساس آزمون توکی انجام شده است. میانگین‌هایی که با حروف یکسان دسته‌بندی شده‌اند در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت شاخصی ندارند.



شکل ۴- تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر باززایی ریزنمونه‌های گلبرگ در *Fritillaria raddeana*

میانگین‌های کمتر از ۵ درصد حذف شده‌است. مقایسه میانگین بر اساس آزمون توکی انجام شده است. میانگین‌هایی که با حروف یکسان دسته‌بندی شده‌اند در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت شاخصی ندارند.

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در ریزنمونه گلبرگ *Fritillaria raddeana*

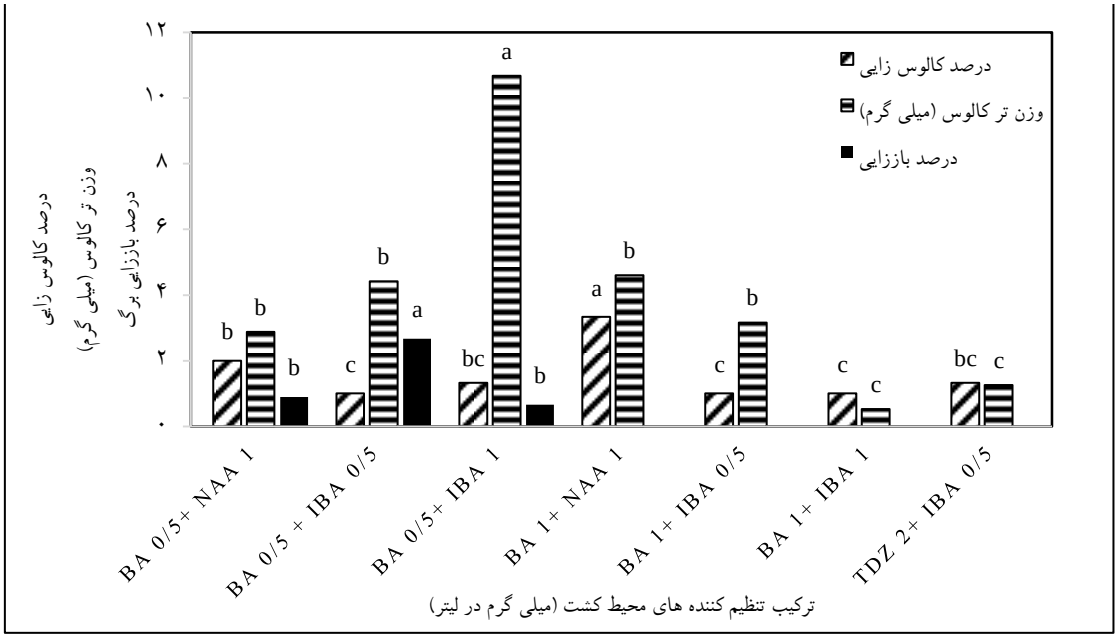
منابع تغییر	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس
محیط کشت	۱۸	۱۰۲۴/۹۶**	۱۳۶۹/۱۸**
خطا	۳۸	۳/۰۵	۱۳/۳۲
ضریب تغییرات		۶/۶۹	۱۲/۰۵

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر محیط کشت بر درصد باززایی در ریزنمونه گلبرگ *Fritillaria raddeana*

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد باززایی
محیط کشت	۹	۳۰۰/۸**
خطا	۲۰	۰/۶
ضریب تغییرات		۵/۳۷

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد



شکل ۵- تأثیر ترکیب تنظیم‌کننده رشد بر کالوس‌زایی، وزن تر کالوس و باززایی ریزنمونه‌های برگ در Fritillaria raddeana میانگین کالوس‌زایی کمتر از ۱ درصد و میانگین وزن تر کالوس و باززایی صفر حذف شده‌است. مقایسه میانگین بر اساس آزمون توکی انجام شده است. میانگین‌هایی که با حروف یکسان دسته‌بندی شده‌اند در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت شاخصی ندارند.

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در ریزنمونه برگ *Fritillaria raddeana*

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی	وزن تر کالوس
محیط کشت	۶	۰/۲۱**	۱/۶۸**
خطا	۱۴	۰/۰۱	۰/۰۲۵
ضریب تغییرات		۸/۶۸	۸/۱۱

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۴- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر محیط کشت بر درصد باززایی در ریزنمونه برگ *Fritillaria raddeana*

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد باززایی
محیط کشت	۲	۰/۴۲**
خطا	۶	۰/۰۱
ضریب تغییرات		۹/۶۴

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد

بحث

با توجه به نتایج آزمایش‌های پیشین (Gholami, 2007) آلودگی داخلی بسیار بالا در ریزنمونه فلس که از متداول‌ترین ریزنمونه‌های مورد استفاده در این جنس است، از موانع عدم موفقیت نسبی یا کامل در کشت بافت این گیاه است و باید ریزنمونه‌های جایگزین مانند اندام‌های هوایی

مورد استفاده قرار گیرد (Witomska & Lukaszewska, 1997; Mohammadi Deh-cheshmeh, *et al*., 2007 and 2008). گلبرگ و برگ از ریزنمونه‌هایی است که به‌دلیل عدم تماس با خاک، دارای آلودگی داخلی و خارجی نسبتا کمتری است. از این‌رو پس از کشت سوخ‌های مادری در گلخانه، در چندین مرحله از رشد گیاه (برگ‌های مریستمی سوخ، برگ‌های تازه رشدکرده و بالغ) برداشت برگ انجام شد. نتایج پژوهش مشابه بر کالوس‌دهی از برگ *F. cirrhosa* بیانگر این است که سن برگ در موفقیت کالوس‌دهی حائز اهمیت است و برگ‌های جوان ۷ روزه بالاترین درصد کالوس‌دهی (۹۵/۲۰ درصد) را داشتند (Yue-hua *et al*., 2011). تفاوت در القای کالوس یا تمایز در برگ در محیط‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف به بلوغ ریزنمونه برگ بستگی دارد که قبل یا بعد از القای گلدهی برداشت شود (Kumar & Kanwar, 2006). نتایج آزمایش‌های انجام شده در کشت سلول در بافت‌های گیاهی نشان می‌دهد که القای کالوس بشدت به سن نونهالی ریزنمونه وابسته است و بافت‌هایی که پس از ورود به مرحله گلدهی برداشت می‌شوند قابلیت بازگشت به حالت مریستمی را ندارند (Bonga, 1987)؛ این مطلب نشان می‌دهد که باززایی به میزان زیادی به مرحله نموی برگ و عوامل داخلی ناشناخته وابسته است. در این آزمایش نیز برگ‌هایی که پس از گلدهی برداشت شدند هیچ‌گونه کالوس‌دهی نداشتند.

موقعیت کالوس‌دهی در گلبرگ *F. raddeana*، فقط در محل اتصال گلبرگ به نهنج که حاوی سلول‌های مریستمی است، انجام شد. این بخش در محدوده نوشجای (محل ترشح نکتار) بوده و تأثیر مثبتی در کالوس‌زایی و باززایی دارد. طبق تحقیقات نیز افزایش سطح قند در نوشجای، موجب افزایش سطح سایتوکینین در گلبرگ می‌شود (Gharehyazie *et al*., 2004; Mohammadi Deh-cheshmeh, *et al*., 2007) که در مراحل بعد در باززایی غیرمستقیم تأثیر به‌سزایی خواهد داشت (Pintos *et al*., 2002). تشکیل کالوس در علف چای (*Hypericum perforatum*) نیز تنها در قاعده گلبرگ دیده شد (Palmer and keller, 2011). برخلاف برخی گزارش‌ها که بهترین پاسخ از غنچه بسته سبز به‌دست آمد (Mohammadi Deh-cheshmeh, *et al*., 2007 and 2008)، هیچ تفاوت محسوسی میان مراحل مختلف تکامل غنچه (در حالت بسته سبز تا زرد) از لحاظ بقا، کالوس‌دهی و باززایی مشاهده نشد.

محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، مناسب‌ترین ترکیب در بین تیمارهای این آزمایش بر روی ریزنمونه گلبرگ بود. در پژوهش بر روی باززایی از گلبرگ میخک (*Dianthus caryophyllus*) نیز در محیط حاوی TDZ، بالاترین درصد باززایی (۷۷ درصد) دیده شد (Frey and Janick, 1991). در مطالعات کشت برگ در هیبریدهای آزالیا بیشترین باززایی (۹۰ درصد) در محیط MS حاوی TDZ و IBA به‌دست آمد (Preece and Imel, 1991) که با بهترین محیط باززایی برگ در این آزمایش (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA) متفاوت بود اما با نتایج به‌دست آمده بر باززایی درون شیشه‌ای عناب (*Ziziphus jujube*) (۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی‌گرم IBA) مشابه بود (Safarnejad, 2015). کالوس‌های فشرده، گره‌مانند و کرم رنگ در آزمایشها بر روی اندام‌های هوایی (گلبرگ، دمگل و برگ) ژربرا (*Gerbera jamesonii*) در کلیه محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف KIN و NAA دیده شد (Kumar & Kanwar, 2006) که تا حدودی مشابه کالوس‌های حاصل از برگ *F. raddeana* در این آزمایش بود. در محیط‌های حاوی 2,4-D نیز کالوس‌های شکننده‌ای تشکیل شد که توانایی باززایی بسیار پایینی داشته (۵/۶۶ درصد) و پس از مدتی سیاه شده و از بین رفتند. مانند این نتایج در مطالعه بر روی سیاهدانه (*Nigella sativa*) نیز دیده‌شد (Hoseinpanahi *et al*., 2016). البته تفاوت در نتایج آزمایشهای مختلف کالوس‌زایی و باززایی آن در ریزنمونه‌های مختلف و گیاهان متفاوت می‌تواند به ژنوتیپ گیاه و نوع سایتوکینین مورد استفاده بازگردد.

در این تحقیق همانند بسیاری از پژوهش‌ها حضور تنظیم‌کننده‌های رشد برای بقای ریزنمونه‌ها در محیط رشد الزامی بود (Aggarwal & Barna, 2004; Liao *et al*., 2004; Mohammadi Deh-cheshmeh *et al*., 2008; Palmer & Keller, 2011). نتایج نشان داد که نقش سایتوکینین در مسیر فعال‌سازی و کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها حیاتی است؛ این اثر تا حدودی می‌تواند به تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ایجاد شده در فرایند تمایززدایی بازگردد. گزارشی بر روی*F. ussuriensis* نشان داد که فعالیت آنزیم‌های مرتبط با این فرایند در حضور TDZ بیش از سایر سایتوکینین‌ها افزایش یافت (Liu *et al*,. 2002). علاوه بر نقش این تنظیم‌کننده در کالوس‌زایی، نوع سایتوکینین مصرف شده در محیط کشت، در باززایی نیز اهمیت زیادی داشت. به‌عنوان مثال در ساقه‌زایی از ریزنمونه آنغوزه (*Ferula assa- foetida L*) از بین تنظیم‌کننده‌های 2ip، BA و KIN بالاترین درصد (۶۶ درصد) در تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد (Nowruzian *et al*., 2016). در ریزنمونه گلبرگ میخک BA نسبت به KIN در تحریک باززایی شاخساره برتری داشت و TDZ نسبت به BA در این مورد مؤثرتر بود و در ریزنمونه ساقه آن نیز TDZ مؤثرترین نوع سایتوکینین تشخیص داده شد (Nugent *et al*., 1991). در ژنوتیپ‌های تمشک (*Rubus*) نیز بالاترین درصد باززایی (۷۸ درصد) در محیط‌های حاوی TDZ دیده شد (Turk *et al*., 1994).

با توجه به مطالب ذکرشده و پژوهش‌های پیشین بر روی این گونه (Salahi Sadr *et al*., 2015)، به‌نظر می‌رسد که TDZ مناسب‌ترین تنظیم‌کننده رشد برای ریزازدیادی از گلبرگ در *F. raddeana* باشد. در آزمایشهای درون شیشه‌ای بر روی اندام‌های مختلف در بیشتر گونه‌های جنس لاله واژگون، تنظیم‌کننده‌های رشد TDZ و BA سایتوکینین-های مناسبی بودند (Kulkhanova *et al*., 2015). در پژوهش‌هایی بر روی *F. melegaris* به‌دلیل باززایی غیرمستقیم از شاخساره (Jevremović *et al*., 2010) و فلس (Nikolić *et al*. 2006)، ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ در محیط بهترین نتایج را به‌همراه داشت و در افزایش درصد باززایی از ریزنمونه گلبرگ آن افزودن ترکیبات حاوی BA به محیط کشت بسیار مؤثر بود (Muraseva *et al*., 2015). تأثیر مفید ترکیبات BA در بهبود نتایج ریزازدیادی از سوخچه‌های *F. unibracteata* نیز دیده‌شد (Gao *et al*., 1999). در کل به‌نظر می‌رسد حضور سایتوکینین اثر مثبت بر بقای ریزنمونه‌ها و کالوس‌دهی دارد؛ زیرا در غیاب این تنظیم‌کننده نه تنها کالوس‌دهی و باززایی قابل توجهی مشاهده نشد، بلکه بقای ریزنمونه‌ها نیز بسیار کاهش یافت. البته این نتیجه را می‌توان به اثر کلی سایتوکینین در تأخیر پیری نیز مرتبط دانست (Arteca, 2013). تحقیقات ثابت کرده است که کاربرد سایتوکینین خارجی باعث افزایش در محتوای داخلی سایتوکینین (Badenoch-Jones *et al*., 1996) و در نتیجه ماندگاری بیشتر ریزنمونه در محیط کشت می‌شود؛ اما کاربرد این تنظیم‌کننده به تنهایی در کالوس‌زایی بی‌تأثیر است که مشابه نتایج بر روی *F.imperialis* (Mohammadi Deh-cheshmeh *et al*., 2007)، سوسن (*Lilium longiflorum*) (Hackett, 1969)، ژربرا (Kumar & Kanwar, 2006) و سنبل (*Hyacinthus orientalis*) (Pierik & Steegmans, 1975) بود. در گزارشی دیگر نیز آمده‌است که سایتوکینین تنها در حضور اکسین باعث تقویت باززایی می‌شود (Appelgren & Heide, 1972).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گلبرگ و برگ به‌دلیل آلودگی داخلی بسیار پایین، دارا بودن تعداد کافی و اندازه ریزنمونه مناسب، مواد گیاهی قابل قبولی را در اختیار پژوهش‌گر قرار می‌دهند. علاوه بر این، در این نوع ریزنمونه‌ها نیازی به برداشت سوخ از طبیعت و تخریب گیاهان مادری نیست، این موضوع به‌ویژه در گونه‌های گیاهی در معرض خطر بسیار حائز اهمیت است. با وجود این، در صورت در دسترس بودن گلبرگ، همانند سایر تحقیقات (Mohammadi Deh-cheshmeh, *et al*., 2007 and 2008) گلبرگ گل *F. raddeana* در زمان کمتر و به‌میزان بیشتر به طیف وسیع‌تری از تنظیم‌کننده‌های رشد پاسخ می‌دهد و درصد کالوس‌زایی و باززایی بسیار بالاتری

نسبت به ریزنمونه برگ دارد. در آزمایشی بر روی میخک نیز، همانند این پژوهش، در بین ریزنمونه‌های مختلف، گلبرگ از برگ و ساقه باززایی بیشتری داشت (Frey & Janick, 1991). البته به‌نظر می‌رسد بتوان با استفاده از برگ گیاهچه‌های حاصل از کالوس (شکل ۱ب) نتایج بهتری گرفت و بازدهی ریزنمونه برگ را بالاتر برد که این مطلب نیازمند به مطالعات تکمیلی بیشتری دارد. از آنجا که این پژوهش نخستین مطالعه ریزازدیادی انجام شده بر روی اندام‌های هوایی گونه *F. raddeana* است اهمیت به‌سزایی دارد. البته القای کالوس و باززایی آن، نخستین قدم در حفاظت و تکثیر درون‌شیشه‌ای این گونه رو به انقراض لاله واژگون است که می‌تواند آغازگر مطالعات گسترده‌تر در این گونه ارزشمند بومی باشد.

منابع مورد استفاده

- Aggarwal, D. and Barna, K.S., 2004. Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 13(1): 77-79.
- Appelgren, M. and Heide, O.M., 1972. Regeneration in Streptocarpus leaf discs and its regulation by temperature and growth substances. Plant Physiology, 27: 417-423.
- Arteca, R.N., 2013. Plant Growth Substances: Principles and Applications. Springer Science & Business Media. 332 p.
- Badenoch-Jones, J., Parker, C.W., Letham, D.S. and Singh, S., 1996. Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in derooted seedlings of oat and wheat. Plant, Cell & Environment, 19(5): 504-516.
- Bonga J.M., 1987. Tree Tissue Culture Applications. Vol. 5: Advances in Cell Culture. 209-239. In: K. Maramorosch (Ed). Academic Press, New York: .297 p.
- Gharehyazie, B., Ebrahimie, E., Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Irannegad, A., Sardari, M. and Salahi Ardacany, A., 2006. Development of commercial protocol for *in vitro* micropropagation of Fritillaria. International System for Agricultural Science and Technology. Record ID=IR2008000622.
- Frey, L. and Janick, J., 1991. Organogenesis in carnation. Journal of the American Society for Horticultural Science, 116(6): 1108-1112.
- Gamborg, O.L., Miller, R. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50(1): 151-158.
- Gao, S.L., Zhu, D.N., Cai, Z.H., Jiang, Y., and Xu, R., 1999. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant – *Fritillaria unibracteata*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59: 197–201.
- Gholami, M. 2007. Micropropagation of of inverted tulip (*Fritillaria imperialis* L.). MSc. Thesis, University of Avicenna. Hamedan, Iran (In Persian).
- Hackett, W.P., 1969. Aseptic multiplication of lily bulblets from bulb scales. The International Plant Propagators' Society, 19: 105-108.
- Hoseinpanahi, S., Majdi, M. and Mirzaghaderi, Gh., 2016. Effects of growth regulators on *in vitro* callogenesis and regeneration of black cumin (*Nigella sativa*), Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(2): 232-242.
- Jevremović, S., Petrić, M., Živković, S., Trifunović, M. and Subotić, A., 2010. Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment. Archives of Biological Sciences, 62(3): 553-558.
- Kulkhanova, D.S., Erst, A.A. and Novikova, T.I., 2015. *In vitro* regeneration from bulbous scales of *Fritillaria sonnikovae*, an endemic species. Russian Journal of Developmental Biology, 46(4): 215-221.
- Kumar, S. and Kanwar, J.K., 2006. Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*. Folia Horticulture, 18(2): 57-64.
- Le Nard, M. and De Hertogh. A.A., 1993. The Physiology of Flower Bulbs. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. 812 p.
- Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X. and Tang, K., 2004. Microprogagation of endangered Chinese aloe. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 76(1), 83-86.
- Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A. and Naderi, R., 2007. Indirect somatic embryogenesis from petal expiant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(11): 1875-1879.
- Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M. and Ebrahimie, E., 2008. Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. Acta Physiologiae Plantarum, 30(3): 395-399.
- Muraseva, D.S., Novikova, T.I. and Erst, A.A., 2015.

– Safarnejad, A., 2015. Effects of growth regulators on *in vitro* regeneration of *Ziziphus jujube*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 23(1): 40-48.
– Salahi Sadr. S., Zakizadeh, H., Naghavi, M.R., Aryakia, E., 2015. Callus induction from bulb-scales explant of endangered wild species of *Fritillaria raddeana*. 9th Congress of Iranian Horticultural Science (Book of Abstract of 9th Congress of Iranian Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahwaz). P.389. (In Persian).
– Subotić, A., Trifunović, M., Jevremović, S. and Petrić, M., 2010. Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Frittilaria meleagris*. Biologia Plantarum, 54(3): 592-596.
– Sun, C.S. and Wang D.Y.,. 1991. *Fritillaria* spp. (Fritillary): *In Vitro* Culture and the Regeneration of Plants. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants III, vol 15: 258–269.
– Liu, Y.J., Yin, H. and Zhu, S.Y., 2002. Thidiazuron induced physiological and biochemical changes in the process of dedifferentiation of Fritillaria ussuriensis. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 23(3): 433-437.
– Turk, B.A., Swartz, H.J. and Zimmerman, R.H., 1994. Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38(1): 11-17.
– Witomska, M. and Lukaszewska. A., 1997. Bulbet regeneration *in vitro* from different explants of *Fritillaria imperialis*. Acta Horticulturae, 430: 331-338.
– Wu, X., Li, X. and Zhang, X., 2008. Molecular analysis of hormone regulated petal regeneration in *Petunia*. Plant Cell Reports, 27: 1169–1176.
– Yue-hua, W.A.N.G., Kuojun, Z. and Lijun, Z., 2011. Study on the high efficiency callus induction system by *Fritillaria cirrhosa* D. Don leaves. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 3:47-55.
In vitro propagation and conservation of rare species *Fritillaria meleagris* L. from floral explants. Contemporary Problems of Ecology, 8(6): 754-763.
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
– Nikolić, M., Radojević, L., Jevremović, S., Trifunović, M. and Subotić, A., 2006. *In vitro* formation of somatic embryos and bulblets of *Fritilllaria meleagris*. - In: Plant, Fungal and Habitats Diversity Investigation and Conservation (Book of Abstracts of IV Balkan Botanical Congress). P. 136.
– Nowruzian, A., Masoumian, M., Ebrahimi, M.A. and Bakhshi Khaniki, G.R., 2016. Micropropagation of *Ferula assa-foetida* L.. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(1): 121-133.
– Nugent, G., Aerdley-Richardson, T., Lu, C.Y., 1991. Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Cell Reports, 10: 477–480.
– Palmer, C.D. and Keller, W.A., 2011. Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 105(1): 129-134.
– Pierik, R.L.M. and Steegmans, H.H.M., 1975. Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb scale segments of hyacinth. Plant Physiology, 34: 14-17.
– Pintos, B., Martin, J.P., Centeno, M.L., Villalobos, N., Guerra, H., Martin, L., 2002. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and nonembryogenic calli of *Medicago arborea* L. Plant Science, 163:955– 960.
– Preece, J. E. and Imel, M. R., 1991. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P. J. M. hybrids. Scientia Horticulturae, 48:159-170.
– Rachinger, K.H, 1990. Flora Iranica, vol. 165, Liliaceae, 61-76.

Regeneration of an endangered Fritillaria (*Fritillaria raddeana*) species via petal and leaf explants

S. Salahi Sadr[1], H. Zakizadeh[2*], M.R. Naghavi[3], J.A. Olfati[2]

1- Ph.D. Student, Department of Horticultural Sciences, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, I.R. Iran.
2*- Corresponding Author, Assist. Prof., Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. Iran. Email: Zakizadeh@guilan.ac.ir
3- Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran.

Received: 13.02.2017 Accepted: 30.07.2017

Abstract

Fritillaria raddeana is one of the most fascinating wild flowers, belonging to Lilliaceae family, native to Iran. It is an important ornamental-medical bulbous plant, tolerant to arid conditions and stony slopes but facing extinction. There have been very few reports exist, so any studies on the species would be of great importance. Regardless of mutation occurrence, successful regeneration will be a prerequisite for further researches that must be done on the endangered plant species. This research presents an *in vitro* callus induction and indirect regeneration of *F. raddeana* via culturing petal and leaf. The leaf (before flowering) and petal (green to yellow flower buds) explants excited from plant and surface sterilized and were cultured on MS media containing different concentrations of Auxin and Cytokinin. The explants were first kept at darkness and 18°C for callus induction, then were transferred to light condition with the same temperature. The temperature was raised to 20°C, when the calli sub cultured into regeneration media. Although due to the low amount of bacterial and fungal contamination, conservation of parent plants, adequate and ready available explants, both petals and leaves are acceptable explants, among them petal showed better and quicker response to variable plant growth regulators. The best medium for callus formation (82.66%) and indirect regeneration (36.66%) via petal explants was MS medium supplemented with 2 mgl^{-1} TDZ and 0.5 mgl^{-1} IBA. Therefore, the mentioned plant growth regulators were more suitable than the others for indirect regeneration of *F. raddeana*.

Keywords: Callus formation, endemic plant, indirect regeneration, plant growth regulators, wild species.