بهینه‌سازی تکثیر درون‌شیشه‌ای آلسترومریا با استفاده از کشت جوانه انتهایی، القاء کالوس و باززایی گیاه

Optimization of *In Vitro* Propagation of *Alstroemeria* by Apical Bud Culture, Callus Induction and Plant Regeneration

فردین نصری[۱*]، یاور وفایی[۲]، علی‌اکبر مظفری[۳] و سیدنجم‌الدین مرتضوی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۰۴

چکیده

این پژوهش در دو آزمایش متفاوت جهت بهینه‌سازی تکثیر درون‌شیشه‌ای آلسترومریا انجام شد. آزمایش اول: اثر بنزیل آمینوپورین (BAP) (صفر، ۰/۵، یک، ۱/۵و دو میلی‌گرم در لیتر) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) روی جوانه‌های انتهایی (۸-۰/۱ سانتی‌متر) رشد یافته از نوک شاخه‌های جوان رقم فوجی (Fuji) و آزمایش دوم: اثر 2,4-D (صفر، یک، دو، چهار، شش و هشت میلی‌گرم در لیتر)، پیکلورام (صفر، یک، دو، چهار، شش و هشت میلی‌گرم در لیتر) و BAP (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) روی القاء کالوس جنینی از برگ‌های اولیه گیاهچه در گونه لیگتو بررسی شد. در هر دو آزمایش محیط‌کشت MS استفاده شد. در آزمایش اول: بالاترین تعداد شاخه‌ها در یک میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (۴/۲۷). نتایج نشان داد که افزایش غلظت BAP باعث کاهش طول شاخساره و میان‌گره شد که می‌تواند به سبب کاهش غالبیت انتهایی حاصل از اثر IBA باشد. بالاترین تعداد ریشه (۳/۲۵) در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون BAP و بالاترین تعداد ریزوم (۳/۵) در محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و بدون IBA به‌دست آمد. در آزمایش دوم: حداکثر کالوس جنینی متراکم (۲۹/۱۳٪) با دو میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، سپس توسط دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. جهت پرآوری کالوس، هر دو نوع کالوس روی MS همراه با ۴ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام نگه‌داری شدند.

واژه‌های کلیدی: آلسترومریا، نوک شاخه، برگ‌های اولیه دانهال، اندام‌زایی، جنین‌زایی

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۲ و ۳. استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۴. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

*: نویسنده مسوول Email: fardin.nasri1@gmail.com

مقدمه

آلسترومریا (*Alstroemeria* spp.) گیاهی تک‌لپه از تیره آلسترومریاسه (Alstroemeriaceae)می‌باشد *ناصری* و *ابراهیمی*؛ *اکر* و *هلی* (Naseri and Ebrahimi, 1998; Aker and Healy, 1990). تکثیر آلسترومریا اغلب به‌صورت رویشی با استفاده از ریزوم صورت می‌گیرد *لین* و همکاران (Lin *et al.*, 1998)، البته محدودیت‌های فصلی نیز وجود دارد *لین* و همکاران (2000a). در نتیجه ریزازدیادی متداول‌ترین روش تجاری تکثیر این گیاه است (*ناصری* و *ابراهیمی*، 1998).

با وجود افزایش کارآیی تکثیر درون شیشه‌ای از طریق ریزوم، همچنان نیاز به بهینه‌سازی روش‌های ریزازدیادی این گیاه زینتی با ارزش احساس می‌شود پیریک و همکاران (Pierik *et al.*, 1988) از طرف دیگر استفاده از قسمت‌های زیرزمینی برای تکثیر درون شیشه‌ای باعث انتشار آلودگی می‌شود که خود مشکل بزرگی می‌باشد *پدرازا-سانتوس* و همکاران (Pedraza-Santos *et al.*, 2006). استفاده از قسمت‌های هوایی می‌تواند بر این مشکل فائق آید، زیرا ضدعفونی اندام‌های هوایی که در قسمت‌های بالای گیاه قرار دارند نسبت به اندام‌های زیرزمینی آسان‌تر است *لین* و همکاران (2000a). اما ساقه‌های هوایی در آلسترومریا از رشد یک ریزوم سیمپودیال ناشی می‌شوند و تحت شرایط طبیعی قسمت‌های هوایی گیاه قادر به تولید شاخه‌های هوایی جانبی نیستند و تنها تعداد کمی جوانه‌های جانبی از ریزوم توسعه می‌یابند و این موضوع باعث کارآیی پرآوری پایین می‌شود *کریستینسن* و همکاران (Kristiansen *et al.*, 1999).

جنین‌های جنسی بالغ نیز با موفقیت برای القای کالوس جنین‌زا به تعداد زیاد استفاده شده است اما چون آلسترومریا به شدت دگرگشن است، نمی‌توان این سیستم را برای واریته‌های موجود پیشنهاد کرد (*لین* و همکاران، 1998) ریزنمونه‌های برگی همراه با گره که از گیاهچه‌های بذری آلسترومریا گرفته شده بودند، منبع خوبی برای ریزازدیادی آلسترومریا می‌باشد و می‌تواند برای تکثیر ارقام موجود مورد استفاده قرار گیرد (*لین* و همکاران، 1998). باززایی آلسترومریا به‌طور عمده از طریق جنین‌های سوماتیکی صورت گرفته *وان‌شایک* و همکاران؛ *لین* و همکاران، 2000a؛ *هاتچینسون* و همکاران؛ *گونزالز-بنیتو* و *آندرسون*؛ *آکوتسو* و *ساتو* (Van Schaik *et al.*, 1996; Hutchinson *et al.*, 1994, 1997; Gonzalez-Benito and Anderson, 1992; Akutsu and Sato, 2002) و سپس تا حدودی اندام‌زایی نموده‌اند *کیم* و همکاران (Kim *et al.*, 2006). تولید کالوس‌های جنینی سست و پیش جنین‌هایی با کارآیی بالا برای تولید گیاهان تراریخت توسط *لین* و همکاران (2000b) صورت گرفته است. آن‌ها گزارش نمودند که این کالوس‌ها دارای رنگ زرد، کروی با قطر حدود یک میلی‌متر و به‌طور معمول دارای دسته‌های متراکم می‌باشند.

دو نوع کالوس جنین‌زا در آلسترومریا مشاهده شده است: کالوس جنین‌زای متراکم و کالوس جنین‌زای سست. کالوس جنین‌زای سست با رنگ زرد- سفید، ریز، گرد و رشد سریع که به آسانی به واحدهای منفرد تقسیم می‌شوند و کالوس جنین‌زای متراکم که ابتدا به رنگ سفید و سپس به حالت زرد رنگ درآمده و تا حدودی رشدش کند و به سختی به واحدهای منفرد تقسیم می‌شوند.

از لحاظ تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده نیز آلسترومریا در محیط‌کشت پایه MS با ۴-۳ درصد ساکارز به‌همراه ۱۰ میکرومول در لیتر بنزیل‌آمینوپورین (BAP) به‌خوبی ریزازدیادی شده است (پیریک و همکاران، 1988). اکسین‌های ایندول بوتیریک اسید (IBA)، نفتالین استیک اسید (NAA) پیکلورام و 2,4-D کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و سایتوکینین‌هایی مانند بنزیل آدنین (BA) بیش‌ترین کاربرد را در کشت بافت آلسترومریا داشته‌اند (*آکوتسو* و *ساتو*، 2002؛*کیم* و همکاران، 2006؛ *هاتچینسون* و همکارن، 2010). به‌طورکلی نسبت زیاد اکسین به سایتوکینین مساعد تشکیل ریشه نابجا و نسبت کم اکسین به سایتوکینین مساعد تشکیل جوانه نابجا می‌باشد *هارتمن* و همکاران (Hartmann *et al.*, 1990). *گونزالزبنیتو* و *آندرسون* (1992) گزارش دادند که کالوس‌های حاصل از جنین‌های بالغ بر روی محیط‌کشت آماده شده با ۴-۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام یا چهار میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ترکیب شده با غلظت‌های مختلف BA یا کینیتین به‌دست آمده است. هم‌چنین تشکیل کالوس‌های جنین‌زا در محیط‌کشت حاوی 2,4-D یا پیکلورام به تنهایی یا در ترکیب با BA از گره ساقه به همراه بافت جانبی توسط *کیم* و همکاران (2006) گزارش شده است.

اندام‌زایی مستقیم با استفاده از ریزنمونه‌های برگی *لین* و همکارن، 1997, 1998, 2000b؛ *نصری* و همکاران (Nasri *et al.*, 2013)، گل‌آذین *پدرزا-سانتوس* و همکاران (2006)، جوانه‌های انتهایی *هاتچینسون* و همکاران (2010) شاخساره از میان قاعده برگ و گره ساقه بدون گذر از فاز کالوس با استفاده از BAP و IBA حاصل شده است و منجر به تشکیل گیاهچه‌های نرمال و آیده‌آلی شده است. بنابراین، جهت دست‌یابی به یک دستورالعمل مناسب جهت القاء کالوس و باززایی آلسترومریا، اثر IBA و BAP بر باززایی و رشد جوانه‌های انتهایی آلسترومریا رقم فوجی و نیز اثر پیکلورام، 2,4-D و BAP برروی برگ‌های اولیه رشد یافته از گیاهچه‌های

آلسترومریا لیگتو (*A. ligtu*) در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دو آزمایش مجزا در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در سال ۱۳۹۱ انجام شد.

آزمایش اول

شاخه‌های آلسترومریا رقم فوجی به طول ۵-۳ سانتی‌متر همراه با جوانه‌های انتهایی رشد یافته از ریزوم در مرحله رویشی (۱۵-۱۰ روز پس از کشت ریزوم‌ها) از گلخانه جمع‌آوری و جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. جهت ضدعفونی سطحی، شاخه‌های حاوی جوانه انتهایی در اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه همراه با حرکت دورانی غوطه‌ور شدند، سپس سه‌بار با آب مقطر استریل شستشو و سپس در سدیم هیپوکلریت ۰/۵ به‌مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل به‌مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. جوانه‌های انتهایی (به طول ۱-۰/۸ سانتی‌متر) از شاخه‌های ضدعفونی شده خارج شد. لایه‌های رویی جوانه (برگ‌های اولیه و ثانویه) حذف شدند و جوانه‌های انتهایی به‌عنوان ریزنمونه اصلی در ظرف‌هایی با گنجایش ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی محیط‌کشت پایه MS *موراشیگ* و *اسکوگ* (Murashige and Skoog, 1962) حاوی سه درصد ساکارز، هفت گرم در لیتر آگار و غلظت‌های صفر، ۰/۵، یک، ۱/۵ و دو میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA کشت شدند (شکل 1a) و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، هشت ساعت تاریکی و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. طی دوره آزمایش، ریزنمونه‌ها چهار بار، هر بار به فواصل چهار هفته واکشت شدند. در این پژوهش صفاتی از قبیل تعداد جوانه، تعداد شاخساره، طول ریشه، تعداد ریشه، تعداد ریزوم، طول شاخساره، طول میان‌گره، طول و عرض برگ و تعداد برگ طی ۱۸-۱۶ هفته بعد از کشت در محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA و BAP ارزیابی شد.

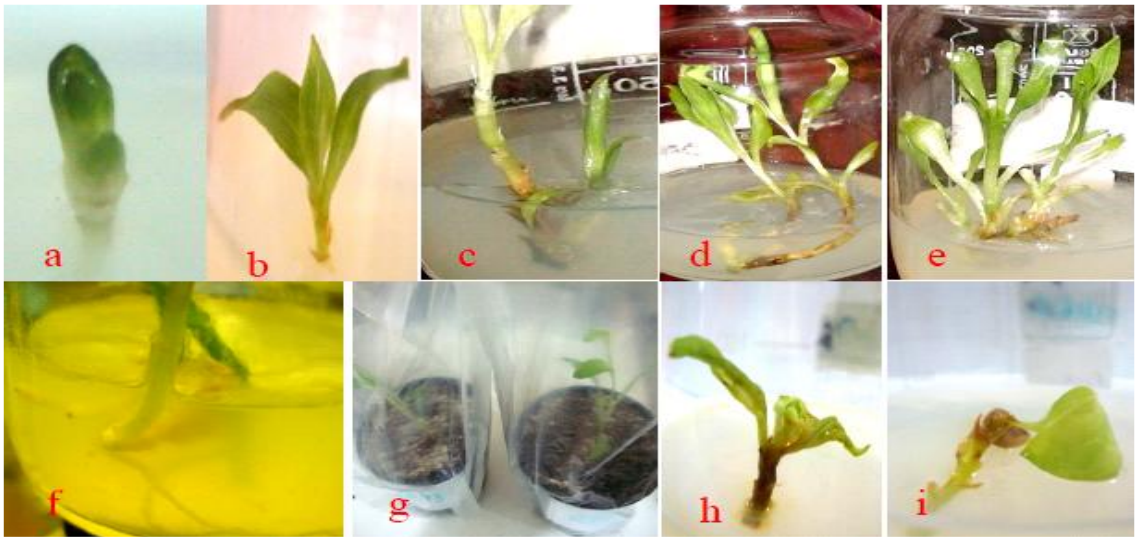
پس از گذشت ۱۸-۱۶ هفته از واکشت‌ها، گیاهچه‌ها همراه با ریزوم و ریشه‌های توسعه یافته از محیط‌کشت جدا شدند و پس از شستشوی آگار از روی ریشه‌ها با آب استریل به داخل گلدان‌های پلاستیکی حاوی پیت‌ماس و پرلیت استریل به نسبت ۲:۱ منتقل شدند. برای سازگاری، گلدان‌ها با پوشش پلاستیکی حاوی چند منفذ پوشانده و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای حفظ رطوبت، روزانه دو تا سه بار اسپری‌پاشی با آب صورت گرفت. پس از طی یک هفته، به تدریج منافذ موجود بیشتر و بزرگ‌تر شدند (شکل 1g). از هفته دوم به بعد، پوشش‌های پلاستیکی به‌تدریج برداشته شدند و در نهایت بعد از سازگاری، گیاهچه‌ها با موفقیت به گلخانه انتقال یافتند.

آزمایش دوم

در این پژوهش بذر آلسترومریا لیگتو (*Alstroemeria ligtu*) به‌عنوان منبع ریزنمونه استفاده شد. ضدعفونی بذرها با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت۱ دقیقه و سدیم هیپوکلریت سه درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. بعد از مرحله ضدعفونی، بذرها در محیط‌کشت پایه MS ۱/۲ همراه با یک درصد ساکارز و هفت گرم در لیتر آگار با pH= ۶ کشت شدند.

تهیه ریزنمونه شش هفته پس از کاشت بذرها انجام شد. در این مرحله بذرهای جوانه زده با یک یا دو برگ اولیه همراه با مقداری ریشه بودند (شکل 1a). به‌منظور تهیه ریزنمونه، برگ‌های اولیه (۷-۸ روز بعد از جوانه‌زنی) از بالای قسمت ساقه‌چه از بذر جدا شدند، به‌طوری‌که ریزنمونه‌هایی به طول ۷-۰/۱ سانتی‌متر (نوک شاخه) جهت القاء کالوس به پتری‌دیش‌های حاوی محیط‌کشت پایه MS همراه با غلظت‌های مختلف 2,4-D (صفر، یک، دو، چهار، شش و هشت میلی‌گرم در لیتر)، پیکلورام (صفر، یک، دو، چهار، شش و هشت میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با BAP (صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. در طی القاء کالوس ریزنمونه‌ها در تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باززایی جنین‌های رویشی و گیاهان در تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی انجام شد (*کیم* و همکاران، 2006). هر سه هفته یک‌بار عمل واکشت ریزنمونه‌ها و انتقال به محیط‌کشت تازه صورت گرفت. تشکیل کالوس جنینی متراکم و سست هشت هفته بعد از رشد مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده بر رشد کالوس (وزن تر کالوس)، به‌طور تصادفی از هر تکرار (هر کدام با ۱۲ ریزنمونه) سه ریزنمونه که دارای کالوس بودند، انتخاب شد. جهت پرآوری کالوس به‌مدت سه هفته بر روی محیط‌کشت MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر پیکلورام قرار داده شدند. واکشت کالوس‌ها هر سه هفته یک‌بار در محیط‌کشت تازه انجام شد. هر پتری‌دیش حاوی ۰/۵ گرم کالوس بود. سپس بر روی محیط‌کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP (صفر، ۰/۵، یک، ۱/۵ و دو میلی‌گرم در لیتر) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای تولید جنین‌های رویشی انتقال داده شدند. جنین‌ها با ۳-۴ شاخه

طبیعی باززا شدند. این شاخساره‌ها به محیط‌کشت ریشه‌زایی که MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴۵ گرم ساکارز و هفت گرم آگار (با pH= ۶) انتقال داده شدند. بعد از مرحله سازگاری، گیاهان ریشه‌دار شده به گلخانه انتقال داده شدند.



شکل ۱: مراحل مختلف باززایی ریزنمونه حاصل از جوانه انتهایی آلسترومریا رقم فوجی، a) جوانه انتهایی سه روز بعد از کشت؛ مقیاس: ۱ سانتی‌متر b) رشد و استقرار ریزنمونه ۱۰روز بعد از کشت، مقیاس: ۲/۵ سانتیمتر؛ c) القا و رشد جوانه‌ها و شاخساره‌های نابه‌جا ۲۵-۳۰ روز بعد از کشت در محیط‌کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، مقیاس: ۴ سانتی‌متر؛ d) پرآوری شاخساره‌ها ۷ هفته بعد از کشت، مقیاس: ۵/۴ سانتی‌متر؛ e) پروآری جوانه و شاخساره‌ها بعد از ۱۲ هفته، مقیاس: ۵/۶ سانتی‌متر؛ f) تشکیل ریزوم و ریشه نابجا بعد از ۱۶-۱۸ هفته، مقیاس: ۲/۷۸ سانتی‌متر؛ g) شروع سازگاری و مقاوم‌سازی گیاهچه‌های تولید شده در گلدان، مقیاس: ۸/۱۱ سانتی‌متر؛ h و i) قهوه‌ای شدن تعدادی از ریزنمونه‌ها به‌ترتیب در ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA، ۲ هفته بعد از کشت ریزنمونه‌ها، مقیاس: ۲/۶۱، ۲/۴۱ سانتی‌متر

Fig. 1: Different regeneration stages of explants derived from shoot tip of *Alstroemeria* var. Fuji. a) Shoot tips 3 day after culture, scale: 1 cm; b) Growth and establishment of explants 10 day after incubation, scale: 2/5 cm; c) Induction and growth of buds and adventitious shoots 25-30 days after culturing on MS medium supplemented with 1 $mg.l^{-1}$ of BAP and 0.1 $mg.l^{-1}$ IBA, scale: 4 cm; d) Shoots proliferation 7 weeks after incubation, scale: 5/4 cm; e) Bud and shoots proliferation after 12 weeks, scale: 5/6 cm; f) Rhizome and root formation after 16-18 weeks after of incubation of explants, scale: 2/78 cm; g) Early acclimation and hardening of plantlets produced in pots, scale: 8/11 cm; h,i) Browning of some explants in MS media containing 1.5 and 2 $mg.l^{-1}$ BAP without IBA, respectively, scale: 2/61, 2/41 cm

تجزیه آماری

آزمایشات به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) و چهار تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. مقایسات میانگین داده‌ها در سطح احتمال ($P\leq$ ۰/۰۵) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. مدل آماری طرح به‌صورت ذیل است:

$$X_{ikl} = \mu + \alpha_k + \beta_l + (\alpha\beta)_{kl} + \varepsilon_{ikl}$$

μ = میانگین جمعیت

α_k = اثر فاکتور A

β_l = اثر فاکتور B

$(\alpha\beta)_{kl}$ = اثر متقابل دو فاکتور،

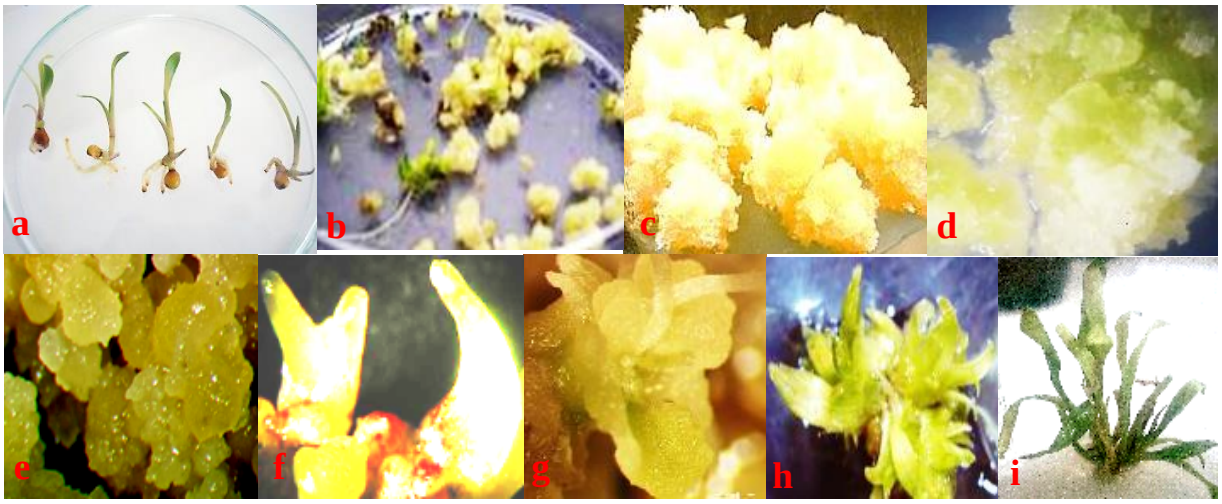
ε_{ikl} = اثر اشتباه آزمایشی

نتایج و بحث

آزمایش اول

بعد از استقرار ریزنمونه‌ها، اولین جوانه‌های نابه‌جا حدود ۳۰-۲۵ روز بعد از کشت در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (شکل ۱c). جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و متقابل BAP و IBA در صفات قابل اندازه‌گیری به جز صفت تعداد برگ، در سطح احتمال ۵٪، اختلاف معنی‌داری باهم دارند (جدول ۱). براساس نتایج جدول ۲، بیش‌ترین تعداد جوانه و شاخساره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون گذر از فاز کالوس با اندام‌زایی مستقیم به‌دست آمد. نتایج مشابهی توسط *لین* و همکاران (1997, 1998, 2000a)، *پدرزا- سانتوس* و همکاران (2006) در آلسترومریا مشاهده شده است. در مورد تعداد شاخساره‌های

تشکیل شده، در هر دو سطح ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، غیر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، سایر غلظت‌های BAP اثر معنی‌داری داشتند. در کل غلظت BAP بین ۱-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تعداد جوانه‌ها و شاخساره‌ها را نسبت به شاهد افزایش داده است اما افزایش غلظت BAP از ۱ به ۲ میلی‌گرم در لیتر تعداد جوانه و شاخساره را کاهش داد. با توجه به نتایج جدول ۲، بین غلظت‌های مختلف BAP بدون استفاده از IBA تفاوت معنی‌داری در تعداد جوانه و تعداد شاخساره‌های تشکیل شده وجود ندارد. تشکیل جوانه و شاخساره از ریزنمونه ها در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: مراحل مختلف القاء کالوس و باززایی گیاه از برگ‌های اولیه دانهال آلسترومریا هیبرید لیگتو. a) دانهال‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای با طول عمر حدود ۸-۷ روز، مقیاس: ۲/۶۴ سانتی‌متر؛ b) القاء کالوس از سطح برگ‌های اولیه ۳ هفته بعد از کشت روی محیط‌کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، مقیاس: ۳/۹۸ سانتی‌متر؛ c) بخش‌های کالوس جنینی زرد روشن، مقیاس: ۶ میلی‌متر؛ d) بخش‌های از کالوس جنینی سست و سفید، مقیاس: ۶ میلی‌متر؛ i-e) مراحل مختلف رشد و نمو جنین‌های رویشی: e) جنین‌های کروی، مقیاس: ۳ میلی‌متر؛ f) مرحله لپه‌ای، مقیاس: ۲ میلی‌متر؛ g، h و i) آغازه شاخه و پرآوری شاخه‌ها ۱۸-۱۶ هفته بعد از کشت (۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA)، به‌ترتیب، ۸ میلی‌متر، ۲ و ۸/۵۳ سانتی‌متر

Fig. 2: Different stages of callus induction and plant regeneration from first seedling leaves of *Alstroemeria ligtu* hybrid. a) *In vitro* grown seedlings about 7-8 days old, scale: 2/64 cm; b) Callus induction from the surface first leaves after 3 weeks on MS medium supplemented with 2 mg l^{-1} of picloram and 0.5 mg l^{-1} BAP, scale: 3/98 cm; c) Compact bright yellow embryogenic sections of callus, scale: 6 mm; d) White and friable embryogenic sections of callus, scale: 6 mm; e-i) Different stages of somatic embryos growth and development: e) globular embryos, scale: 3 mm; f) cotyledonous stage, scale: 2 mm; g, h and i) Shoot-primordia and shoots multiplication after 16-18 weeks of culture (1mg/l^{-1} BAP and 0.1 mg/l^{-1} IBA), scale: 8 mm, 2 and 8/53 cm, respectively

از لحاظ فاکتورهای ارزیابی شده به‌عنوان معیارهای کارآیی تکثیر، محیط‌کشت MS کامل حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین نتایج را نشان داد به‌طوری‌که تعداد شاخساره‌های نابه‌جای تشکیل شده نسبت به تیمار شاهد به ۴/۲۷ شاخه در هر ریزنمونه افزایش پیدا کرد (جدول ۲). اما افزایش بیشتر غلظت BAP (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش طول و تعداد شاخساره شد *علی* و همکاران (Ali *et al.*, 2003). نتایج مشابهی توسط *هاتچینسون* و همکاران (2010) با ریزنمونه‌های گرفته شده از شاخه‌های انتهایی آلسترومریا گزارش شده است. با توجه به نتایج این پژوهش و گزارش‌های سایر پژوهشگران *پودوزیسنکا* و همکاران؛ حمید *اوغلی* و همکاران (Podwyszynska *et al.*, 1997; Hamidoghli *et al.*, 2007) نقش عمده‌ای در باززایی و القای تشکیل جوانه‌ها و شاخساره‌های نابجا در آلسترومریا دارد.

سن و منبع ریزنمونه بر قابلیت باززایی برخی گونه‌ها مؤثر است چنگ و همکاران (Chang *et al.*, 1996). در این پژوهش نیز چون ریزنمونه‌ها ۱۰-۱۵ روز بعد از سبز شدن از ریزوم تهیه شده بودند، به نظر می‌رسد که اکسین ریزنمونه‌ها برای رشد عادی کافی بود اما برای تولید جوانه‌های نابجا و در نهایت تشکیل شاخساره نیاز به میزان کمی اکسین و میزان بالایی سایتوکینین (نسبت ۱:۱۰ اکسین به سایتوکینین) می‌باشد که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

آلسترومریا یک گیاه زینتی با کارآیی تکثیر پایین می‌باشد و این از مشکلات تولید تجاری آن است. بیشتر روش‌های

ریزازدیای آلسترومریا براساس باززایی گیاه از نوک ریزوم متمرکز شده است *پدرسن* و همکاران؛ *کریستینسن* و همکاران؛ *چیاری* و *بریجن*، پدرزا-*سانتوس* و همکاران (Pedersen *et al.*, 1996; Kristiansen *et al.*, 1999; Chiari and Bridgen, 2000). از محدودیت‌های این روش تخریب گیاه مادری، میزان آلودگی بالا و میزان پرآوری پایین در مقایسه با دیگر روش‌ها می‌باشد *پدرزا- سانتوس* و همکاران (2006). در این پژوهش با استفاده از ریزنمونه‌های جوانه انتهایی ساقه و غلظت‌های مختلف BAP و IBA تا حدی این مشکلات رفع شدند و یک محیط‌کشت مناسب برای ریزازدیادی آلسترومریا جهت اهداف پژوهشی یا تجاری به دست آمد.

غلظت‌های مختلف BAP و IBA اثر معنی‌داری بر تعداد برگ تولید شده از ریزنمونه‌ها داشتند (جدول ۲). بیش‌ترین تعداد برگ (۱۱/۴۶ برگ به ازای هر ریزنمونه) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و کم‌ترین آن در تیمار شاهد (۶/۲۵ برگ به ازای هر ریزنمونه) مشاهده شد (جدول ۲). با افزایش غلظت IBA از ۰/۱ به ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تعداد برگ‌ها کاهش، اما طول و عرض برگ افزایش یافت، به‌طوری‌که بزرگ‌ترین طول و عرض برگ (۳/۹۱ و ۱/۱۵ سانتی‌متر) در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد (جدول ۲). بیش‌ترین تعداد برگ در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد که تأثیر هم‌زمان BAP بر افزایش تقسیم سلولی و اثر IBA بر افزایش طول سلول، باعث افزایش تعداد برگ شده است. وجود کلروز در تعدادی از برگ‌های تیمار ۰/۲ میلی‌گرم و فاقد BAP نشان از تأثیر سایتوکینین در تأخیر پیری و تحریک انتقال مواد غذایی و نیز تا اندازه‌ای جلوگیری از اثرات اکسین به‌عنوان محرک تولید اتیلن می‌باشد *تایز* و *زایگر* (Taiz and Zeiger, 2006).

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده

Table 1: Analysis of variance the traits measured

	میانگین مربعات Mean squares										
منابع تغییرات SOV	درجه آزادی df	تعداد برگ Leaf number	طول میان‌گره (میلی‌متر) Internode length (mm)	طول شاخساره (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	طول برگ (سانتی‌متر) Leaf length (cm)	عرض برگ Width leaf (cm)	تعداد جوانه Number bud	تعداد شاخساره Number shoot	تعداد ریشه Number root	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	تعداد ریزوم Number rhizom
BAP	4	11.75**	5.60**	12.87**	4.34**	0.39**	3.71**	5.12**	5.29**	9.33**	6.32**
IBA	2	3.07**	11.04**	82.33**	5.51**	0.343**	4.87**	15.45**	6.95**	4.60**	7.12**
IBA × BAP	8	1.52ns	0.29**	1.81**	0.098**	0.011**	0.22*	0.39*	0.49*	1.79**	1.49**
خطا Error	45	0.91	0.07	0.14	0.004	0.003	0.41	0.68	0.49	0.065	0.39
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		4	2.42	4.10	2.42	7.70	40.22	12.93	16.25	14.88	12.52

* و ** به‌ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns: غیر معنی‌دار

* and ** statistically significant at 5 % and 1% levels, respectively and ns: no significant

براساس نتایج جدول ۲ بین غلظت‌های مختلف IBA و BAP از نظر تأثیر بر طول شاخساره و طول میانگره تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیش‌ترین طول شاخساره ۱۲/۴۸ سانتی‌متر در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بدون BAP و کم‌ترین آن ۶/۵۴ سانتی‌متر در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA مشاهده شد. بیش‌ترین طول میان‌گره در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA (۱۲/۷۷ میلی‌متر) حاصل شد (جدول ۲). در یک محیط‌کشت بدون سایتوکینین (مانند BAP) مقدار اکسین طبیعی داخلی موجود در بافت گیاه باعث غالبیت انتهایی می‌گردد *خالقی* و همکاران (Khaleghi *et al.*, 2008). با افزایش غلظت IBA طول شاخساره و میان‌گره نیز افزایش یافت که این ثابت کننده نقش اکسین‌ها در افزایش طول سلول می‌باشد *رانجان* و همکاران (Ranjan *et al.*, 2003).

بالاترین میزان تولید ریزوم (۳/۵) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز بیش‌ترین تعداد ریزوم (۳/۲۵) و طول (۴/۲۶ سانتی‌متر) ریشه در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. با افزایش مقدار BAP تعداد ریشه‌ها کاهش و با افزایش مقدار IBA در محیط‌کشت، تعداد ریزوم‌های تولیده شده از قاعده شاخساره کاهش یافت. در تیمار شاهد و هم‌چنین در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA به‌ترتیب

هیچ ریزوم و ریشه‌ای تشکیل نشد. افزودن IBA به محیط‌کشت نسبت به محیط‌کشت عاری از IBA به‌طور معنی‌داری تولید ریشه در ریزنمونه‌ها را بهبود بخشید. بیش‌ترین تعداد ریزوم در حضور BAP، مطابق با نتایج *گابریس زوسکا* و *همپل* (Gabryszewska and Hemple, 1985) و پیریک و همکاران (1988) است (جدول ۲). اثرات مثبت اکسین و منفی سایتوکینین بر تشکیل ریشه در آلسترومریا به اثبات رسیده است *کریستینسن* و همکاران (1999) و ریشه‌زایی اغلب در غلظت ۰/۲-۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAAاتفاق افتاده است *پدرزا- سانتوس* و همکاران (2006). در پژوهش حاضر بیش‌ترین تعداد ریشه‌ها در محیط‌کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد و تشکیل ریشه یک مرحله حساس در ریزازدیادی آلسترومریا می‌باشد *خالقی* و همکاران (2008) و نتایج پژوهش حاضر تأییدکننده نقش IBA در القای ریشه از شاخساره می‌باشد.

جدول ۲: تأثیر سطوح مختلف ۶- بنزیل آمینوپورین (BAP) و ایندول ۳- بوتیریک اسید (IBA) بروی صفات اندازه‌گیری شده در آلسترومریا رقم فوجی

Table 2: Effect of different levels N6-Benzylaminopurine (BAP) and Indole-3-butyric acid (IBA) on measured parameters in *Alstroemeria* cv. Fuji

تعداد ریزوم Number rhizome	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	تعداد ریشه Number root	تعداد شاخساره Number shoot	تعداد جوانه Number bud	عرض برگ (سانتی‌متر) Width leaf (cm)	طول برگ (سانتی‌متر) Leaf length (cm)	طول شاخساره (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	طول میان‌گره (میلی‌متر) Internode length (mm)	تعداد برگ Number leaf	تیمار Treatments IBA×BAP	
0.00g	1.33cde	0.100cdef	0.75f	0.50f	0.76ef	2.91e	7.25g	10.60efg	6.25g	0	0
0.76defg	2.82b	2.48ab	2.30cde	1.00def	1.05b	3.44b	11.00c	12.32b	9.48bcde	0.1	0
0.51efg	4.26a	3.25a	1.27ef	0.76ef	1.15a	3.91a	12.48a	12.77a	7.55fg	0.2	0
1.27cdef	1.72c	1.00cdef	2.49bcde	1.81bcde	0.68fg	2.28g	7.00gh	10.20gh	8.51ef	0	0.5
1.85bcd	2.50b	1.77bc	3.50abc	2.47ab	0.80de	3.11d	10.95c	11.48c	10.50abc	0.1	0.5
0.25fg	2.63b	1.48bcd	2.23cde	1.75bcde	0.91c	3.48b	11.93b	11.56c	9.50bcde	0.2	0.5
3.50a	1.63cd	0.75cdef	2.75bcd	2.00bcd	0.58h	1.93h	6.80gh	10.10hi	8.77def	0	1
2.25b	2.56b	1.24cde	4.27a	3.03a	0.68fg	2.35g	9.95d	10.95de	11.46a	0.1	1
1.00cdefg	1.35cd	1.75bc	2.50bcde	1.50bcdef	0.85cd	3.22c	10.77c	11.45c	11.00ab	0.2	1
2.55b	0.94efg	0.25ef	2.25cde	1.27cdef	0.48i	1.67i	6.52h	9.75ij	7.53fg	0	1.5
1.60bcde	0.32def1	1.00cdef	3.71ab	2.25abc	0.58h	1.97h	9.05e	10.65def	10.25abcd	0.1	1.5
1.00cdefg	1.01defg	1.25cde	1.49def	1.22cdef	0.71fg	2.72f	9.60d	11.02d	10.44abc	0.2	1.5
2.44b	0.43h	0.00f	2.50bcde	1.25cdef	0.46i	1.63i	6.54h	9.57j	7.00g	0	2
2.00bc	0.73gh	0.50def	3.75ab	2.00bcd	0.49i	1.92h	8.10f	10.32fgh	9.24cde	0.1	2
1.25cdef	0.85fg	1.00cdef	1.75def	1.00def	0.64gh	2.33g	8.70e	10.40fgh	10abcde	0.2	2

میانگین‌های دارای حروف مشترک درهر ستون براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵فاقد اختلاف معنی‌دار هستند

Means in a column having same letter are not significantly different at the 5% level as determined by Duncan's

جدول ۳: تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده

Table 3: Analysis of variance the traits measured

میانگین مربعات Mean squares				
منابع تغییرات SOV	درجه آزادی df	کالوس جنینی متراکم Compact embryogenic callus	کالوس جنینی سست Friable embryogenic callus	وزن تر کالوس با ریزنمونه Callus fresh weight with explant
2,4-D	5	803.209**	24.607**	14.202**
BAP	1	50.956**	14.06**	1.37ns
2,4-D × BAP	5	16.549**	2.87**	1.08ns
خطا Error	24	0.83	0.42	0.083
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		9.69	14.19	13.26

* و ** به‌ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns: غیر معنی‌دار

* and ** statistically significant at 5 % and 1% levels, respectively and ns: no significant

جدول ۴: تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده

Table 4: Analysis of variance the traits measured

میانگین مربعات Mean squares				
وزن تر کالوس با ریزنمونه Callus fresh weight with explant	کالوس جنینی سست Friable embryogenic callus	کالوس جنینی متراکم Compact embryogenic callus	درجه آزادی df	منابع تغییرات SOV
35.04**	80.60**	620.49**	5	Picloram
6.18*	28.99**	148.15**	1	BAP
0.74ns	6.15**	45.10**	5	Picloram × BAP
0.83	0.83	0.83	24	خطا Error
12.28	18.45	5.79		ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

* و ** به‌ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns: غیرمعنی‌دار

* and ** statistically significant at 5% and 1% levels, respectively and ns: no significant

جدول ۵: تأثیر سطوح مختلف 2,4-D، پیکلورام و بنزیل آمینوپورین (BAP) روی القاء کالوس‌های جنینی در آلسترومریا هیبرید لیگتو (*Alstroemeria ligtu* hybrid)

Table 5: Effect of different levels 2,4-D, Picloram and N6-Benzylaminopurine (BAP) embryonic callus induction in *Alstroemeria ligtu* hybrid

وزن تر کالوس با ریزنمونه (گرم) Callus fresh weight with explant (gr)	کالوس جنینی سست (درصد) Friable embryogenic callus (%)	کالوس جنینی متراکم (درصد) Compact embryogenic callus (%)	تیمار Treatment		وزن تر کالوس با ریزنمونه (گرم) Callus fresh weight with explant (gr)	کالوس جنینی سست (درصد) Friable embryogenic callus (%)	کالوس جنینی متراکم (درصد) Compact embryogenic callus (%)	تیمار Treatment	
			BAP (mg.l)	Picloram (mg.l)				BAP (mg.l)	2,4-D (mg.l)
0.00g	0.00j	0.00n	0	0	0.00g	0.00j	0.00n	0	0
0.00g	0.00j	0.00n	0.5	0	0.00g	0.00j	0.00n	0.5	0
2.57f	1.33ij	5.8m	0	1	2.13h	0.00j	7.11m	0	1
3.21ef	1.29ij	6.78m	0.5	1	2.75gh	2.71h	9.73kl	0.5	1
3.65cdef	4.97ef	14.61g	0	2	2.98de	3.45gh	10.77jk	0	2
4.71bcde	9.74b	29.13a	0.5	2	3.12hi	5.61de	19.4e	0.5	2
5.91b	5.91de	25.81b	0	4	3.69ef	2.33hi	11.43ij	0	4
7.99a	6.21de	26.11b	0.5	4	5.67g	4.96ef	13.11h	0.5	4
4.97bcd	7.98c	17.44f	0	6	3.22g	0.00j	9.63kl	0	6
5.55b	11.36a	21.3d	0.5	6	2.79g	0.00j	8.91l	0.5	6
5.00bc	4.11fg	18.41ef	0	8	3.28g	0.00j	10.36jkl	0	8
5.61b	6.47d	23.12c	0.5	8	3.31g	0.00j	12.41hi	0.5	8

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵فاقد اختلاف معنی‌دار هستند

Means in a column having same letter are not significantly different at the 5% level as determined by Duncan's

گزارش شده است که افزایش غلظت سایتوکینین (۲ میلی‌گرم در لیتر BA) میزان قهوه‌ای شدن گیاهچه‌های آلسترومریا افزایش می‌یابد. در پژوهش حاضر نیز ریزنمونه‌های بدون توانایی باززایی (تیمار شاهد و تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP) در قسمت نوک جوانه انتهایی شروع به قهوه‌ای شدن کرده و در نهایت از بین رفتند (شکل i و 1h). این می‌تواند به‌دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنلی آزاد شده از سلول‌های گیاهی و تراوش آن به درون محیط‌کشت باشد که در نهایت باعث مرگ سلول‌ها می‌شود *شارما* و *رامامورتی* (Sharma and Ramamurthy, 2000).

در این پژوهش، ۵-۴ ماه بعد از کشت ریزنمونه‌های آلسترومریا رقم فوجی، گیاهچه‌های باززا شده همراه با ریشه و ریزوم‌های توسعه یافته به گلخانه منتقل شدند. با توجه به نتایج *لین* و همکاران (1997, 1998)، در پژوهش حاضر نیز القای شاخه‌ها و جوانه‌های نابه‌جا از قاعده ساقه بدون گذر از فاز کالوس پس از کاشت ریزنمونه‌ها (۲۵-۳۰ روز) یک نوع باززایی جوانه نابه‌جا به‌شمار می‌رود، زیرا از جوانه‌های جانبی از قبل موجود بوده و یا از آغازه جوانه که از قبل در گیاه وجود داشته باشد، حاصل نشده است. بر همین اساس دستورالعمل ریزازدیادی معرفی شده در این تحقیق را می‌توان برای اهداف مهندسی ژنتیک آلسترومریا و انتقال ژن نیز توصیه نمود. هرچند که برای اثبات دقیق این موضوع نیاز به بررسی‌های بافت‌شناسی دارد.

جدول ۶: تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده

Table 6: Analysis of variance the traits measured

میانگین مربعات Mean squares			
درصد جنین های نمو یافته به گیاهچه Percentage of embryos developed to plantlet	تعداد جنین‌های نمو یافته به گیاهچه Number of embryos developed to plantlet	درجه آزادی df	منابع تغییرات SOV
2575.98**	202.20**	4	BAP
820.69**	36.30**	1	IBA
19.42**	13.80**	4	IBA × BAP
2.37	0.100	20	خطا Error
4.07	8.85		ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

* و ** به‌ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns: غیرمعنی‌دار

* and ** statistically significant at 5 % and 1% levels, respectively and ns: no significant

آزمایش دوم

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و متقابل BAP، 2,4-D و پیکلورام در صفات اندازه‌گیری شده درصد کالوس متراکم و سست، تفاوت‌های معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد اما در صفت اندازه‌گیری شده وزن تر کالوس اثر متقابلی بین BAP با 2,4-D یا پیکلورام مشاهده نشد (جداول ۳ و ۴). نتایج نشان داد که تشکیل کالوس جنینی بر روی محیط‌کشت MS حاوی 2,4-D، پیکلورام و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به‌خوبی القاء شد (جدول ۵). این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط *کیم* و همکاران (2006) و *خالقی* و همکاران (2008) مطابقت دارد.

بعد از ۲ هفته بر روی محیط‌کشت القاء کالوس، کالوس‌ها از محل های زخم شده ریزنمونه ها پدیدار شدند (شکل ۲b). در این آزمایش ۳ نوع کالوس شامل: کالوس‌های جنینی متراکم، کالوس‌های جنینی سست (شکل d و ۲c) و کالوس‌های نرم و آبکی (کالوس غیرجنینی) مشاهده شد. کالوس غیرجنینی در نهایت تبدیل به رنگ قهوه‌ای و زود از بین رفت. کالوس غیرجنینی به‌طور معمول توانایی نمو به جنین سوماتیکی را ندارد *کرمی* (Karami, 2008). کالوس جنینی سست دارای رنگ سفید تا زرد، کروی، رشد سریع و به آسانی به واحدهای مجزا تقسیم شد. کالوس جنینی متراکم ابتدا دارای رنگی سفید و سپس به زرد تغییر رنگ پیدا کرد و همچنین دارای رشدی کندتر و به سختی به واحدهای مجزا تقسیم شد.

اثر پیکلورام در القاء کالوس از ریزنمونه ها در مقایسه با 2,4-D به طور معنی داری کارآیی بیشتری داشت. اگرچه *کیم* و همکاران (2006) گزارش دادند، 2,4-D کارآیی بیشتری در القاء کالوس جنینی متراکم نسبت به پیکلورام دارد، اما گزارشاتی وجود دارد که کارآیی بیشتر پیکلورام را در این مورد ثابت نموده است. براساس نتایج جدول ۵، بیش‌ترین میزان کالوس جنینی متراکم در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیش‌ترین کالوس جنینی سست در ۶ میلی‌گرم در لیتر پیکلورام همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP القاء شد. افزایش بیشتر (بالاتر از ۲ میلی‌گرم در لیتر) در مقدار 2,4-D و پیکلوام باعث کاهش القاء هر دو نوع کالوس شد. نتایج مشابهی توسط *خالقی* و همکاران (2008) در آلسترومریا مشاهده شده است. پیکلورام به‌طور موفقیت‌آمیزی در کشت بافت در گیاهان مختلف بدون اثرات روی کالوس و متعاقباً گیاهان باززایی شده، استفاده شده است *کانگر* و همکاران؛ *لین* و همکاران؛ *والورد* و همکاران؛ *هونگ* و همکاران (Conger *et al.*, 1983; Lin *et al.*, 2000b; Valverde *et al.*, 1987; Huong *et al.*, 1999). برتری پیکلورام بر ترکیبات شبه اکسینی مانند 2,4-D پیش‌تر گزارش شده است *فیچ* و همکاران (Fitch, *et al.*, 1990). باور بر این است که این تنظیم‌کننده رشد به‌طور سریع در محل‌های هدف متابولیزه می‌شود. *کارون* و همکاران (Karun *et al.*, 2004) در نخل آرکا (*Areca catechu* L.)، *کرمی* و *کردستانی* (Karami and Kordestani, 2007) و *هوشینو* و همکاران (Hoshino *et al.*, 2008) و *گونزالز- بنیتو* و *آلدرسون* (Gonzalez-Benito and Alderson, 1992) در آلسترومریا گزارش دادند، کالوس‌های تشکیل شده در محیط‌کشت MS حاوی پیکلورام دارای رشد بیشتر، کالوس‌های گره‌دار، جنین‌های رویشی و کروی می‌باشند. کالوس جنینی به‌طور معمول در غلظت‌های نسبتاً بالای اکسین‌ها به‌ویژه 2,4-D مشاهده شده است *امیراتو* (Ammirato, 1987) و به نظر می‌رسد که تشکیل یک سلول جنینی با متیله شدن DNA هسته‌ای در حضور غلظت بالای 2,4-D مرتبط می‌باشد *لوشیاو* و همکاران (Loschiavo *et al.*, 1989).

جدول ۷: تأثیر سطوح مختلف 2,4-D، پیکلورام و بنزیل آمینوپورین (BAP) روی نمو جنین به گیاهچه در آلسترومریا هیبرید لیگتو (*Alstroemeria ligtu* hybrid)

Table 7: Effect of different levels 2,4-D, Picloram and N6-Benzylaminopurine (BAP) on embryo development to plantlet in *Alstroemeria ligtu* hybrid

تیمار Treatment		تعداد جنین‌ها در هر پتری‌دیش Number of embryos petrdish	تعداد جنین‌های نمو یافته به گیاهچه Number of embryos developed to plantlet	درصد جنین‌های نمو یافته به گیاهچه Percentage of embryos developed to plantlet
IBA (mg/l)	BAP (mg/l)			
0	0	29	3g	10.70h
0.1	0	31	7e	22.95e
0	0.5	29	12d	17.85l
0.1	0.5	30	14c	48.59c
0	1	32	16b	55.50b
0.1	1	29	22a	73.65a
0	1.5	33	13cd	39.70d
0.1	1.5	29	14c	55.50b
0	2	37	7e	19.26f
0.1	2	35	5f	14.63g

میانگین‌های دارای حروف مشترک درهر ستون براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ فاقد اختلاف معنی‌دار هستند

Means in a column having same letter are not significantly different at the 5% level as determined by Duncan's

افزودن BAP به هر دو ماده 2,4-D و پیکلورام به‌جز در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم در لیتر به مقدار اندکی توانست تشکیل کالوس جنینی سست و متراکم را افزایش دهد. اثر BAP یا دیگر ترکیبات سایتوکینینی روی جنین‌زایی به قابلیت BAP جهت تحریک تولید داخلی هورمون‌های طبیعی شبیه زآتین (Zeatin) نسبت داده شده است *زایر* و *مپس* (Zaerr and Mapes, 1982).

باززایی گیاه در آلسترومریا به‌طور عمده‌ای از طریق جنین‌زایی رویشی صورت گرفته است (*آکوتسو* و *ساتو*، 2002؛ *گونزالز- بنیتو* و *آلدرسون*، 1992؛ *هاتچینسون* و همکاران، 1994, 1997؛ *لین* و همکاران، 2000a؛ *وان شایک* و همکاران، 1996) و باززایی با این روش نسبت به روش اندام‌زایی *لین* و همکاران (Lin *et al.*, 1997) بیشتر و سریع‌تر بوده است. کارآیی سیستم‌های باززایی گیاه براساس کالوس جنینی برای تعدادی از گونه‌ها از جمله رز *مارکنت* و همکارن (Marchant *et al.*, 1996)، کنتاکی بلوگراس پاسپالوم *مرکل* و همکاران (Merkele *et al.*, 1995)، گونه‌ای گون (آستراگالوس) *لو* و همکاران (Luo *et al.*, 1999)، گیاهان خانواده سوسن *لوشیاو* و همکاران (Loschiavo *et al.*, 1989) و *Hylomecon vernali* *کیم* و همکاران (2003) گزارش شده است.

برای کاربرد بیوتکنولوژی جهت برنامه‌های اصلاحی آلسترومریا، کارآیی بیشتر باززایی گیاه برای تعداد وسیعی از گونه‌های این گیاه ضروری است. در مطالعه اخیر ثابت شد که قابلیت استفاده برگ‌های اولیه حاصل از دانهال رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای به‌عنوان یک ریزنمونه مناسب برای القاء کالوس با ظرفیت باززایی بالا می‌باشد.

بیش‌ترین باززایی گیاه در ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. آشکار است که موفقیت باززایی گیاه بستگی به ژنوتیپ گیاه دارد. بنابراین توسعه یک روش جدید باززایی برای تحقیقات بیشتر بر روی آلسترومریا لازم و ضروری است. در مطالعات از پیش انجام شده روی کشت بافت آلسترومریا استفاده از BAP برای باززایی گیاه آلسترومریا مؤثر بوده است (*گونزالز- بنیتو* و *آلدرسون*، 1992؛ *کیم* و همکاران، 2006؛ *لین* و همکاران، 1997, 1998, 2000a,b؛ *پدرزا- سانتوس* و همکارن، 2006؛ *وان شایک* و همکاران، 1996؛ *هاتچینسون* و همکاران، 2010؛ *نصری* و همکاران، 2013). با این‌حال در مطالعه ما ترکیب BAP با IBA برای باززایی بسیار مؤثر واقع شد. بنابراین BAP یک نقش کلیدی را در باززایی آلسترومریا بازی می‌کند.

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و متقابل BAP و IBA در صفات اندازه‌گیری شده درصد و تعداد جنین‌های نمو یافته به گیاهچه، تفاوت‌های معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (جدول ۶). بیش‌ترین تعداد (۲۲) و درصد (۷۳/۳۳) جنین‌های نمو یافته به گیاهچه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (جدول ۷). استفاده از سایتوکینین در ترکیب با اکسین در القاء و باززایی جنین‌های رویشی در کشت کالوس بعضی از گونه‌های گیاهی گزارش شده است *مول* و *ون آرنولد*؛ *کرمی*، 2008؛ *گراندو* و همکاران؛ *باسکاران* و *اسمیز* (Mol and Von Arnold, 1991; Grando *et al.*, 2002; Bhaskaran and Smith, 1990) در این مطالعه افزودن غلظت پایین IBA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به محیط‌کشت حاوی BAP به‌طور معنی‌داری تعداد و درصد جنین‌های نمو یافته از کالوس های جنین‌زا پس از گذر از مراحل مختلف جنینی (با تشکیل جنین کروی، لپه، رشد آغازه شاخه و پرآوری شاخه‌ها به گیاهچه از ریزنمونه‌ها را افزایش داد (شـکل ۲e-i). ضرورت یا نیاز BAP

برای باززایی جنین‌های رویشی ممکن است تابع یا وابسته به منبع ریزنمونه باشد که توسط *باسکاران* و *اسمیز* (1990) گزارش شده است.

کاربرد بیوتکنولوژی در برنامه‌های اصلاحی گیاه نیاز به کارآیی باززایی در محیط‌کشت درون شیشه‌ای دارد. جنین‌زایی رویشی نشان داده است که چندین مزیت در مقایسه با دیگر سیستم‌های تکثیر درون شیشه‌ای دارد که شامل میزان پرآوری بالا، امکان منجمدسازی (Cryopreservation) کالوس جنینی، پتانسیل برای کشت‌های مایع سوسپانسیونی، فن آوری بذور مصنوعی می‌باشند *مرکل* و *دئان* (Merkle and Dean, 2000)، بنابراین پرآوری کالوس جنینی یکی از قوی‌ترین جنبه‌های جنین‌زایی رویشی برای تکثیر انبوه و انتقال ژن است (*مرکل* و همکاران، 1995).

پروتکل باززایی تشریح شده در این مطالعه می‌تواند به آسانی در تغییر ژنتیکی گیاه یا ترایخته کردن آلسترومریا مورد استفاده قرار گیرد که در گیاهان دیگری مانند *Perilla frutescens* مورد استفاده قرار گرفته است *تاریق حسین* و همکاران؛ *کیم* و *لی* (Tariq Hossain *et al.*, 2010; Kim and Lee, 2007).

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۰-۱۲ متن انگلیسی مراجعه شود.