بررسی کالوس‌زایی از گلبرگ گونه‌های وحشی در معرض خطر لاله واژگون (*Fritillaria raddeana*) در شرایط درون شیشه‌ای

سلاله صلاحی صدر [1*] ، هدایت زکی‌زاده[2]، محمدرضا نقوی[3]، الیاس آریاکیا[4]

۱-دانشجوی دکترا علوم باغبانی، دانشگاه گیلان. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان.۳-استادگروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران. ۴- عضو هیات علمی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی

*نویسنده مسئول: solale.salahi@gmail.com

چکیده

لاله واژگون (*Fritillaria spp.*)، از ژئوفیت‌های در معرض خطر خانواده سوسن بوده و یکی از زیباترین گیاهان دنیاست؛ گونه *Fritillaria raddeana* که گونه مورد بررسی در این پژوهش است تنها در ایران، ترکمنستان و به طور معدود در پاکستان و افغانستان شناسایی شده‌است. این گونه دارای ارزش زینتی و دارویی بوده و پتانسیل اقتصادی بالایی دارد که به منظور معرفی و اهلی‌سازی این گیاه بومی خودرو، نخستین اقدام بررسی روش‌های مناسب ازدیاد می‌باشد. این پژوهش یک سیستم کارآمد برای کالوس‌زایی از کشت غنچه گل در محیط درون شیشه ارائه می‌دهد. گلبرگ‌ها در مراحل متفاوت رشد غنچه سبز تا غنچه زرد در حالت بسته برداشت شده، پس از ضدعفونی به عنوان ریزنمونه استفاده شدند و تاثیر مقادیر متفاوت سایتوکینین و اکسین بر کالوس-زایی مورد ارزیابی قرار گرفت. اکثر ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون در مسیر کالوس‌زایی قرار گرفتند. همچنین کالوس‌زایی در کلیه ریزنمونه‌ها در محل اتصال گلبرگ به نهنج ایجاد شد.

کلمات کلیدی: کالوس‌زایی، گیاه در معرض انقراض، ، تنظیم‌کننده رشد.

مقدمه

گیاه لاله واژگون *Fritillaria raddeana* Regel که در منابع با نام *Fritillaria askabadensis* Micheli و در فارسی به نام لاله واژگون زرد یا لاله گرگانی نیز شناخته می‌شود، گیاهی چند ساله و سوخ‌دار است و یکی از ۱۷ گونه لاله واژگون شناسایی شده در ایران است (Rachinger, 1990) که پتانسیل بالایی جهت استفاده به عنوان گیاه زینتی و نیز داروئی دارا می‌باشد. این گل که در گرگان و خراسان شمالی و به ندرت در مازندران یافت می‌شود، از لحاظ ظاهری بسیار شبیه گونه کاملا شناخته شده *F.imperialis* از همین زیرجنس (*Petilium*) است، اما رنگ آن زرد لیمویی یا زرد کمرنگ و ارتفاع آن کمتر است (Rix, 1977; Rachinger, 1990). ازدیاد آن از طریق سوخ و بذر است. سوخ دارای ۱تا ۵ فلس آبدار، کامل یا نیمه رشد کرده و پوشش‌دار بوده که همین امر آن را مناسب رشد در مناطق سنگلاخی و خشک می‌نماید (Baranova, 1981). سرعت ازدیاد طبیعی این گونه بسیار پایین است و به دلیل محدود بودن سلول‌های مریستمی درصد ازدیاد با روش‌های سنتی فلس‌برداری یا تقسیم سوخ نیز بسیارکم است (Le Nard & De Hertogh, 1993). *F.raddeana* از راه بذر نیز تکثیر می شود، اگرچه ۵ تا ۷ سال از بذر تا تبدیل شدن به یک گیاه با قابلیت گل‌دهی زمان می‌برد (Le Nard & De Hertogh, 1993). ازدیاد درون شیشه‌ای این گونه گیاهان که دارای محدودیت تکثیر بوده و از لحاظ اقلیم دچار تهدید شده‌اند مزایای قابل توجهی را داراست (Fay, 1992). قطعات فلس، از ریزنمونه‌های مرسوم در کشت بافت گیاهان پیازی است که در آزمایش‌های متعددی بر روی این جنس مورد استفاده قرار گرفته-است (Witomska & Lukaszewska, 1997). استفاده از سوخ به عنوان منبع ریزنمونه اغلب با آلودگی بالای قارچی و باکتریایی مواجه می‌شود. در گونه *F.raddeana* به دلیل تعداد کم فلس در هر سوخ، مشکل جدی‌تر است. علاوه بر این استفاده از سوخ به عنوان منبع ریزنمونه باعث از بین رفتن گیاهان مادری این گونه در معرض خطر می‌شود.

علی‌رغم اهمیت این گل، تا به امروز هیچگونه گزارشی مبنی بر آزمایشات درون شیشه‌ای در این گونه دیده نشده است. هدف از این مطالعه دستیابی به کالوس از ریزنمونه گلبرگ *F.raddeana* با به کارگیری نسبت‌های مختلف سیتوکینین(TDZ, BA) و اکسین (IBA) در بستر کشت می‌باشد؛ تا در آزمایشات آتی با استفاده از کالوس‌های حاصله برای اندام‌زایی و سایر مطالعات استفاده شود. طبق تحقیقات این گزارش نخستین آزمایش انجام شده در زمینه کشت بافت در این گونه است.

مواد و روش‌ها

سوخ‌های *F.raddeana* از رویشگاه‌های طبیعی در استان خراسان شمالی جمع‌آوری و پس از گذراندن دوره سرمایی در دمای ۴°C، در گلدان و درون گلخانه با شرایط دمایی مناسب کشت شدند. غنچه‌های گل سبز تا زرد در حالت بسته از گیاهان با ارتفاع ۳۰ تا ۵۰ سانتی متری برداشت شدند. با محلول سدیم هیپوکلریت ٪ ۱/۵ (v/v) برای ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و ۳ مرتبه با آب مقطر دوبار استریل شستشو شدند. ریزنمونه‌های گلبرگ به‌صورت افقی بر روی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) در شیشه‌های کشت قرار گرفت، دور درب شیشه‌ها با پارافیلم پوشیده شد و به مدت ۳۰ روز در تاریکی و دمای ۲±۱۸ °C قرار گرفت. پس از القای کالوس و تورم آن به محیطی با شدت نور $۲۰\mu molm^{-2}s^{-1}$ و دمای ۱±۲۰ °C انتقال یافت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی (CRD) با ۴ تکرار (۴ شیشه کشت) و ۳ ریزنمونه در هر شیشه انجام شد. تیمارها شامل اثرات تکی و متقابل سیتوکینین (N^6-benzyladenine (BA), Thidiazuron (TDZ): ۰،۰/۱،۱ ،۲ mgl^{-1}) و اکسین (Indole-3- ۰،۰/۵ ،۱ mgl^{-1} butyric acid (IBA)) بود. پس از ایجاد کالوس از بهترین محیط برای ازدیاد کالوس استفاده و هر ۱۴روز واکشت صورت گرفت. ۴۵ روز پس از کشت گلبرگ و حدود ۱۴روز پس از انتقال ریزنمونه‌ها به روشنایی، تعداد ریزنمونه‌های بقایافته با تقسیم تعداد ریزنمونه‌های زنده به تعداد کل کشت شده ارزیابی شد؛ هم‌چنین درصد تشکیل کالوس نیز حدود یک‌ماه پس از انتقال، از تقسیم تعداد ریزنمونه‌های کالوس داده به تعداد نمونه‌های زنده‌مانده به دست آمد.

بحث ونتیجه‌گیری

تشکیل کالوس در گلبرگ *F.raddeana*، فقط در محل اتصال گلبرگ به نهنج که حاوی سلول‌های مریستمی است، صورت گرفت. این بخش در محدوده نوشجای (محل ترشح نکتار) بوده و تاثیر مثبتی در کالوس‌زایی و باززایی دارد (Mohammadi Dehcheshmeh et al., 2007 & 2008). طبق گزارشات محمدی ده چشمه و همکاران (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007)، و ابراهیمی و همکاران (Ebrahimie et al. 2006 & 2007)، افزایش سطح قند در نوشجای، موجب افزایش سطح سیتوکینین در گلبرگ می‌شود، علاوه بر این تعویض پیوسته محیط کشت نیز، باعث افزایش سطح هورمون‌های داخلی می‌شود که این امر در فعال‌سازی تولید کالوس و باززایی غیرمستقیم تاثیر بسزایی خواهد داشت (Feito et al. 1994; Pintos et al. 2002).

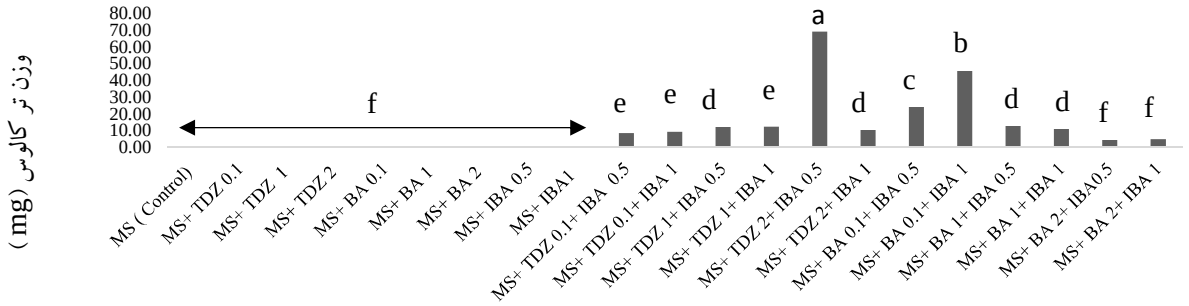
جدول ۱ تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی از گلبرگ و شکل۱ مقایسه اثرات این مواد را بر بقای ریزنمونه‌های *F.raddeana* نشان می‌دهد. با توجه به اینکه ریزنمونه‌های شاهد همگی پیش از تشکیل کالوس از بین رفتند؛ می‌توان نتیجه گرفت حضور تنظیم‌کننده‌های رشد برای بقای گلبرگ در محیط رشد الزامی است. هم‌چنین هیچ تفاوت شاخصی بین کالوس حاصله از گلبرگ‌ها در مراحل متفاوت تا قبل از باز شدن غنچه مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد، نقش سیتوکینین در مسیر فعال‌سازی و کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها حیاتی است؛ بیشترین درصد پاسخ ریزنمونه از گلبرگ در تیمار تنظیم کننده رشد (٪۶۸/۷) شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (شکل۲). اگرچه در محیط حاوی BA نیز کالوس تشکیل شد، اما کالوس‌های حاصله از این تیمار در مراحل بعد ضعیف‌تر بوده، اکثرا از بین رفته و در صورت بقا نیز نسبت به کالوس‌های حاصل از محیط حاوی TDZ که دارای رنگ سبز براق بودند، از شادابی بسیار کمتری برخوردار بوده و دارای رنگ شیری وکدر بودند. این اثر تا حدودی می تواند به تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ایجاد شده در پروسه تمایززدایی بازگردد؛ گزارشات نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های مرتبط با این پروسه در حضور تیدیازرون بیش از سایر سیتوکینین‌ها افزایش می‌یابد (Liu et al,. 2003). با این-حال درکل به‌نظر می‌رسد حضور سیتوکینین اثر مثبت بر بقای ریزنمونه‌ها و کالوس‌دهی دارد. چراکه در غیاب این تنظیم‌کننده نه

تنها کالوس‌دهی قابل توجهی مشاهده نشد، بلکه بقای ریزنمونه‌ها نیز بسیار کاهش یافت؛ این نتیجه را می‌توان به اثر کلی سیتوکینین در تاخیر پیری نیز مرتبط دانست(Arteca, 2013). تحقیقات ثابت کرده است که کاربرد سیتوکینین خارجی باعث افزایش در محتوای داخلی سیتوکینین (Badenoch-Jones et al., 1996؛Richmond & Lang, 1957) و در نتیجه ماندگاری بیشتر ریزنمونه در محیط کشت می‌شود. کاربرد سیتوکینین به تنهایی نیز باعث عدم تشکیل کالوس می‌شود که با نتایج محمدی ده‌چشمه و همکاران (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007) مطابقت دارد. بر طبق گزارشات، سیتوکینین به طور موثری برای القای اندام‌زایی بدون کالوس در بسیاری از دولپه‌ای ها (Zapata et al., 1999) وتک لپه‌ای ها می‌تواند مفید باشد (Lin et al., 1997)، در تحقیق حاضر نیز کاربرد این تنظیم‌کننده به تنهایی و در هیچ غلظتی موجب القای کالوس نشد.

از آنجاکه این پژوهش نخستین مطالعه‌ی ریزازدیادی انجام گرفته بر روی *F.raddeana* است دارای اهمیت بسزایی می‌باشد. القای کالوس در این‌گونه رو به انقراض لاله واژگون، نخستین قدم در حفاظت، باززایی و تکثیر درون‌شیشه‌ای این گونه است. نتیجه این تحقیق هم‌چنین می‌تواند منجر به تولید جنین‌های سوماتیکی و بذور سنتتیک شود که در نهایت به توسعه این گیاه در سطح تجاری نیز کمک خواهدکرد.

جدول۱- بقای ریزنمونه‌ها، کالوس‌زایی و وزن تر کالوس در محیط MS با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در *Fritillaria raddeana*

	تیمار (mgl^{-1})	(%) ریزنمونه‌های بقایافته	(%) القای کالوس	(mg) وزن تر کالوس
۱	MS (Control)	۰	۰	۰
۲	TDZ ۰/۱	۰	۰	۰
۳	TDZ ۱	۰	۰	۰
٤	TDZ ۲	۰	۰	۰
٥	BA ۰/۱	۰	۰	۰
٦	BA ۱	۰	۰	۰
۷	BA ۲	۰	۰	۰
۸	IBA۰/٥	۲	۰	۰
۹	IBA۱	۳	۰	۰
۱۰	TDZ۰/۱+ IBA۰/٥	۲۲	۱۱	۸/۲۱
۱۱	TDZ ۰/۱+ IBA ۱	۱٤	۷	۹
۱۲	TDZ ۱+ IBA ۰/٥	۳۱	٦۲/٥	۲۱/۸۰
۱۳	TDZ ۱+ IBA۱	٦	٤/۳	۱۲/۱۰
۱٤	TDZ ۲+ IBA۰/٥	٦۸/۷	۷٤	٦۹
۱٥	TDZ ۲+ IBA۱	۳۰	۲٤/٦	۲۱
۱٦	BA۰/۱+ IBA۰/٥	۲۳	۲٤	۳۰/٥۰
۱۷	BA۰/۱ + IBA۱	۳٤/٤۰	۳۱	٤۸
۱۸	BA۱ + IBA۰/٥	۲۲	۳٦	۲۲/۲۰
۱۹	BA۱ + IBA۱	۱۰	٤۱	۱۹/٥۰
۲۰	BA۲ + IBA۰/٥	۳	۱۱/۱۰	٦/٥۰
۲۱	BA۲ + IBA۱	٥/۸	۳	٤/٥٥



شکل ۱- مقایسه اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد (mgl^{-1}) بر کالوس‌زایی گلبرگ *Fritillaria raddeana* بر اساس وزن تر کالوس(mg)

شکل۲- کالوس‌های حاصل از گلبرگ *Fritillaria raddeana* در محیط MS حاوی TDZ ۲ + IBA ۰/۵ mgl^{-1}

منابع

1. Arteca, R. N.2013. Plant growth substances: principles and applications. Springer Science & Business Media,.p: 66.
2. Badenoch-Jones J., Parker, C.W., Letham, D.S. & Singh, S. 1996. Effect of cytokinins supplied via the xylem at multiples of endogenous concentrations on transpiration and senescence in de-rooted seedlings of oat and wheat. Plant Cell Environ. 19: 504-516.
3. Baranova, M. The Ecologo-morphological Peculiarities of the Underground Organs of the Representatives of the Genus *Fritillaria* (Liliaceae). 1981. Bot. Zhurn. 66 (10): 1369- 1387.
4. Ebrahimie E, Habashi AA, Mohammadie-Dehcheshmeh M, Ghannadha M, Ghareyazie B, Yazdi-Amadi B .2006. Direct shoot regeneration from mature embryo as a rapid and genotype independent pathway in tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (*Cuminum cyminum* L.) genotypes. In Vitro Cell Dev Biol Plant 42:455–460.
5. Ebrahimie E, Naghavi M.R, Hosseinzadeh A, Behamta M.R, Mohammadi-Dehcheshmeh M, Sarrafi A, Spangenberg G. 2007. Induction and comparison of different in vitro morphogenesis pathways using embryo of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a model material. Plant Cell Tissue Organ Cult 90:293–311.
6. Fay, M. 1992. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. In Vitro Cell Dev Biol Plant 28:1–4.
7. Feito I, Rodiguez A, Centeno ML, Sanchez-Tames R, Fernandez B.1994, Effect of the physical nature of the culture of medium on the metabolism of benzyladenine and endogenous cytokinins in *Actinidia deliciosa* tissues cultured in vitro. Physiol Plant 91:449–453.
8. Le Nard, M. & A.A. De Hertogh. 1993. The Physiology of Flower Bulbs. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. P: 718- 739.
9. Lin, H.S., M.J. De Jeu & P. Jacobsen, 1997. Direct shoot regeneration from excised leaf explants of in vitro grown seedlings of *Alstromeria*. Plant Cell Rep., 16: 770-774.
10. Liu, Y. J., Yin, H., & 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.
11. Mohammadi-Dehcheshmeh, M., A. Khalighi, R. Naderi, M. Sardari & E. Ebrahimie. 2008. Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. Pak J. Biol. Sci. 10: 1875-1879.
12. Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Khalighi, A., & Naderi, R. 2007. Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild Population of *Fritillaria imperialis*. Pak J. Biol. Sci., 10(11), 1875-1879.
13. Pintos B, Martin JP, Centeno ML, Villalobos N, Guerra H, Martin L. 2002, Endogenous cytokinin levels in embryogenic and nonembryogenic calli of *Medicago arborea* L. Plant Sci 163:955–960
14. Rachinger, k.H. 1990. Flora Iranica, vol 165, Liliaceae, p: 61-76.
15. Richmond, A.E. & A. Lang, 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. Science, 125: 650-651.
16. Rix, M. 1977. *Fritillaria* L. (Liliaceae) in Iran. Iranian Journal of Botany 1(2):75–95.

17. Witomska, M. & A. Lukaszewska. 1997. Bulbet regeneration in vitro from different explants of *Fritillaria imperialis*. Acta Hortic. 430: 331-338.
18. Zapata, C., Park, S.H., K.M. El-Zik & Smith, R.H., 1999. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. Theor. Applied Genet. 98: 252-256.

Callus induction from bulb-scales explant of endangered wild species of *Fritillaria raddeana*

S. Salahi Sadr*[1], H. Zakizadeh[2], M.R. Naghavi[3], E. Aryakia[4]

1- Ph.D. Candidate, Horticultural Science, University of Guilan; 2- Assistant Prof., Dep. of Horticultural Science, University of Guilan; 3- Professor, Dep. of Biotechnology, Tehran university; 4- Iranian Biological Resource Center, Karaj, Iran

*Corresponding author: solale.salahi@gmail.com

Abstract

Fritillaria raddeana Regel is an endangered bulbous plant, so *in vitro* micropropagation of this plant will have a great importance for germplasm conservation and commercial production. Wild populations of this plant are facing extinction and need urgent conservation. *F.raddeana* belonging to the Liliaceae family, is an important ornamental and medicinal plant and mostly found in North-Eastern parts of Iran such as Golestan and Khorasan provinces of Iran. This paper presents an efficient system for in vitro callus formation of these populations by petal culturing of flower buds. Petals at different developmental stages, green-closed flower bud and yellow-closed flower bud, were used as explants, and the effects of various proportions of cytokinin to auxin were evaluated. Among the different combinations of Thidiazuron (TDZ) and Indole-3-butyric acid (IBA) tested, MS medium supplemented with 2 mg L^{-1} TDZ + 0.5 mg L^{-1} IBA was the best treatment for callus formation. In both green-closed and yellow-closed flower bud stage, callus formed at the end of petal where it was connected to the receptacle. This research presents petal as a reliable material for micropropagation and germplasm conservation of *F. raddeana*.

Key words: Regulated deficit irrigation, Lawn, Buffalograss, Fescue