Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The role of phosphorus, potassium and calcium on in vitro culture of lily bulblet

Naser Askari

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Horticulture, University of Jiroft, P.O. Box 364, Jiroft, Iran; E-mail address: na.askari@yahoo.com

Reza Ghahremani

MSc Student, Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran; E-mail address: rghahremani@ut.ac.ir

Abstract

Objective

Lily is known as the third main bulbous flower in the world that used for cut flowers and pots. Bulblet as a staple procedure is known for propagation of this plant. Due to the high performance of *in vitro* bulblets regeneration, the use of this method can reduce the costs production of this plant and also reduction of water and soil pollution due to minimizing the field area for *ex vitro* propagation. The size of lily bulblets produced *in vitro* is smaller than *ex vitro* propagated bulblets. For this purpose, several concentrations of phosphorus, potassium and calcium were used to investigate their role on lily bulblet growth under *in vitro* condition.

Materials and methods

In this experiment, 'Santander' cultivar was used for bulblet growth of lily. For this purpose, the effect of five strength (0, 0.5, 1, 2, 3) of macro elements (phosphorus, potassium and calcium) based on MS medium on bulblet regeneration percentage, bulblet number, bulblet fresh weight, scale explant fresh weight, and fresh weight of leaf and root was surveyed.

Results

The results of the experiment clearly showed the effect of all three elements on the growth of bulblet, so that the limitation of any of the elements (0 strength) caused serious disorders in all explants. With increasing the concentration of the studied elements, the bulblet regeneration percentage increased significantly. The maximum in vitro bulblet regeneration percentage (95.3

%) was found in explants grown on medium supplemented with double-strength of phosphorous. All three macroelementsnotably phosphorus played a major role on lily bulblets growth. According to results, application of double-strength of phosphorus caused the highest number of bulblet compared to test with 11.6. A considerable decrement in the fresh weight of leaves (16 g) and roots (10 g) was observed in the absence of calcium in the culture medium.

Conclusions

In general, phosphorus and calcium play a vital role in the regeneration of lily bulblets in vitro, so that on the one hand, double-strength of phosphorus had the highest amount of bulblet regeneration and fresh weight of the bulblets and on the other hand, shortage of calcium had the lowest amount in all parameters. So it is recommended to increase the concentrations of above mentioned macroelementsfor obtaining bigger bulblets.

Keywords: Calcium, Bulblet growth, Lily, Potassium, Phosphorus.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Askari N, Ghahremani R (2023) The role of phosphorus, potassium and calcium on in vitro culture of lily bulblet. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 27-42.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 27-42. DOI: 10.22103/jab.2022.19673.1407

Received: November 8, 2022. Received in revised form: December 13, 2022.

Accepted: December 14, 2022. Published online: February 18, 2023

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

نقش عناصر فسفر، پتاسیم و کلسیم بر رشد درون شیشه‌ای پیازچه سوسن

ناصر عسکری

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران، رایانامه: na.askari@yahoo.com

رضا قهرمانی

دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران، رایانامه : rghahremani@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۷ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۳

چکیده

هدف: سوسن به عنوان سومین گل پیازدار مهم در جهان با کاربری گل بریده و گلدانی شناخته میشود. تولید پیازچه برون و درون شیشه‌ای از معمول‌ترین روش‌های تکثیر این گیاه به شمار می‌رود. با توجه به عملکرد بالای ازدیاد درون شیشه‌ای، استفاده از این روش می‌تواند موجب کاهش هزینه‌های تولید در این گیاه شود و به طبع مانع ازآلودگی‌های خاک و آب با کاهش سطح زیر کشت مزرعه‌ای می شود. ترکیبات محیط کشت به‌ویژه عناصر در شت مغذی نقش مهمی در رشد پیازچه‌های سوسن دارند. به همین منظور، از غلظت‌های مختلف عناصر فسفر، پتاسیم و کلسیم جهت بررسی تاثیر آنها در رشد درون شیشه‌ای پیازچه استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش اثر پنج غلظت (۰،۰,۵،۱،۲،۳) از عناصر فسفر، پتاسیم و کلسیم بر روی درصد پیازچه‌زایی، تعداد پیازچه، وزن تر اندام‌ها (پیازچه، برگ و ریشه) و وزن‌تر ریزنمونه فلس در پیازچه‌های سوسن رقم سانتاندر بررسی گردید.

نتایج: نتایج آزمایش تاثیر چشم‌گیر هر سه عنصر در رشد پیازچه را نشان می دهد، بطوری‌که فقدان هر یک از عناصر موجب بروز اختلالات شدید در تولید پیازچه در شرایط دورن شیشه‌ای گردید. با افزایش غلظت عناصر مورد مطالعه، میزان پاسخ به پیازچه‌زایی به صورت معنی‌داری افزایش یافت. غلظت دو برابر فسفر نسبت به غلظت پایه موجب افزایش معنی‌دار در درصد پیازچه‌زایی، تعداد پیازچه، وزن‌تر پیازچه، وزن‌تر فلس و وزن‌تر برگ و ریشه نسبت به سایر تیمارها شد. افزایش ۳ برابری در غلظت هر کدام از عناصر مورد استفاده موجب کاهش شاخص‌های یاد شده گردید.

نتیجه‌گیری: بطورکلی، نتایج نشان داد فسفر و کلسیم نقش حیاتی در رشد پیازچه در گیاه سوسن ایفا می کنند، بطوری‌که از یک سو افزایش فسفر بیشترین میزان پیازچه‌زایی و وزن نهایی پیازچه را خود نشان داد و از سوی دیگر، در تیمار بدون کلسیم تمامی شاخص‌های رشد پیازچه به شدت کاهش یافت.

کلیدواژه‌ها: پتاسیم، پیازچه زایی، سوسن، فسفر، کلسیم.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عسکری ناصر، قهرمانی رضا (۱۴۰۲) نقش عناصر فسفر، پتاسیم و کلسیم بر رشد درون شیشه‌ای پیازچه سوسن. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۲۷-۴۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

سوسن (Lilium spp.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی پیاز دار در جهان است که متعلق به خانواده سوسن سانان (Liliaceae) و دارای بیش از ۱۰۰ گونه است (Askari et al. 2016) . در میان روش های تکثیر این گیاه، با توجه به فشردگی، انبارمانی بهتر و حمل و نقل راحت‌تر، مرسوم‌ترین روش ازدیاد استفاده از فلس پیاز (در زمان شکستن رکود) می باشد، اما تولید به روش سنتی بسیار به کندی (زمان‌بر) صورت می پذیرد و به‌دلیل عملکرد پایین آن پاسخگوی نیاز فعلی بازار نیست (Zhang et al. 2017; Askari et al. 2018). مزیت‌هایی همچون سرعت بالای تکثیر، تولید گیاهان م شابه با والد،کاهش زمان گلدهی، تولید گیاهان عاری از ویروس و راندمان بالا موجب ترغیب تولیدکنندگان جهت استفاده از روش ریزازدیادی می‌گردد (Bakhshaie et al. 2016).برر سی نتایج سایر مطالعاتی که بر روی ریزازدیادی سو سن صورت گرفته ا ست ن شان می‌دهد عوامل مهمی همچون ژنوتیپ (Bahr and Compton 2004)، تنظیم کننده‌های رشد (Sahoo et al. 2018) محیط کشت (Azeri and Öztürk 2021)و نور (Yan-long et al. 2010) در بهبود رشد و عملکرد پیازچه‌های سوسن موثر است. در محیط ک شت‌های مورد ا ستفاده در ک شت بافت، مواد معدنی بی شترین سهم را از ترکیبات محیط ک شت دارند. معمول‌ترین محیط کشت در کشت بافت گیاهی محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) است که برای رشد شاخساره‌های تنباکو بهینه‌سازی شده است .(Murashige and Skoog 1962) لذا برای رشد سایر اندام‌های گیاهی مانند ریزوم و پیاز نیاز به تحقیقات بیشتری برای د ستیابی به ترکیب منا سب این عنا صر می‌با شد .(Pumisutapon 2012) فسفر از مهم‌ترین عنا صر در شت مغذی ا ست که به شکل $H_2PO_4^-$ بو سیله ریشه گیاهان جذب می شود. فسفر می‌تواند به دو شکل فسفات معدنی (Pi) و فسفات ا ستر (O-P) در

گیاهان یا ترکیبات گیاهی مانند ATP و RuBP وجود داشته باشد .(Zhang et al. 2018) همچنین فسفر از ترکیبات اصلی اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و آنزیم‌های گیاهی می‌باشد که کمبود آن در گیاهان باعث محدود شدن رشد و نمو به‌ویژه از طریق اختلال در فتوسنتز می‌شود .(Shibli et al. 2001) از سوی دیگر، فسفر نقش اساسی در ساختن نشاسته در کلروپلاست دارد و کمبود فسفات معدنی موجب کاهش شدید سنتز نشاسته در کلروپلاست می شود (Zhang et al. 2018). پتاسیم یک کاتیون تک ظرفیتی با قدرت انتقال بالا در سطح سلولی و در فواصل طولانی در گیاه است. همچنین، پتاسیم نقش مهمی در تنظیم pH سیتوپلاسم، فشار اسمزی و طویل شدن سلولی، فعال شدن بیش از پنجاه آنزیم، تعادل یونی در سلول، متابولیسم نشاسته و ساخت پروتئین و فتوسنتز دارد (Saito and Uozumi 2020) بنابراین، کمبود پتاسیم می‌تواند باعث اختلال جدی در رشد گیاهان باشد. عنصر کلسیم از کاتیون‌های اصلی در گیاهان است که قدرت انتقال آن در گیاه به دلیل اتصال به مولکول‌های بزرگتر کمتر از پتاسیم و فسفر می‌باشد. کلسیم نیز در فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها دخیل است و نقش کلیدی در فرایند تبخیر و تعرق و همچنین فتوسنتز دارد. (Sardans and Peñuelas 2021) کلسیم به مقدار زیادی در واکوئل وجود دارد و می تواند تا ۱۰ در صد وزن خشک در بعضی از گیاهان را تشکیل دهد و این غلظت بالای کلسیم منجر به ایجاد خسارت در گیاهان نمی شود. کمبود کلسیم در بسیاری از گیاهانی که در شرایط درون شیشه ای ازدیاد می شوند باعث سوختگی نوک شاخساره ها بعد از چند نوبت واکشت می شود (Bairu et al. 2009).

همچنین تاثیر مثبت کودهای نیتروژن، پتاسیم و فسفر در شاخص‌های رشدی پیازچه‌های سوسن در روش تکثیر سنتی به وضوح اشاره گردیده است (Niedziela et al. 2008). افزودن پتاسیم در محلول غذایی می تواند در بهبود روابط آبی و وزن خشک این گیاه موثر واقع شود (Barrera-Aguilar et al. 2013). از سوی دیگر، افزودن کودهای کلسیمی هچون نیترات کلسیم در سوسن موجب افزایش القای پیازچه و همچنین تعداد آن‌ها در ازدیاد برون شیشه‌ای می شود (Bala et al. 2018). افزون بر این، در پژوهشی که بر روی سوسن انجام پذیرفت، افزایش غلظت تیمار کلسیمی در مرحله پیازچه‌زایی برون شیشه‌ای موجب افزایش معنی‌دار پارامترهای رشدی از یک سو و همچنین بهبود طول عمر گلجای گل بریده حاصل از این پیازچه‌ها گردید (Seyedi et al. 2013). از آنجا که رشد پیازچه‌های بدست آمده در کشت بافت سوسن بسیار کمتر از پیازچه‌های بدست آمده از روش‌های برون شیشه‌ای است (Askari and Visser 2022) لذا بهینه سازی ترکیبات محیط کشت می‌تواند تاثیر زیادی در بهبود رشد پیازچه‌های درون شیشه‌ای سوسن داشته باشد. با بررسی نتایج سایر پژوهش‌های مرتبط در پیازچه‌زایی درون شیشه‌ای به نظر می‌رسد، از نقش عناصر کلیدی در رشد پیازچه سوسن اطلاعات اندکی وجود دارد و این پژوهش نقش سه عنصر حیاتی فسفر، پتاسیم و کلسیم در رشد پیازچه های سوسن در شرایط درون شیشه ای را برای دستیابی به ترکیب مناسب‌تر در شت مغذی‌های محیط کشت بررسی کرده است.

مواد و روش‌ها

از پیازهای سو سن رقم سانتاندر (Lilium cv. 'Santander') که در دمای ۱ درجه سلسیوس انبار شده بود جهت انجام آزمایش‌ها استفاده گردید. به منظور سترون‌سازی، فلس‌های گیاه به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد غوطه‌ور گردید. سپس، سه بار با آب مقطر استریل آبشویی گردید (Askari et al. 2014). در نهایت، تا زمان استفاده در آب مقطر استریل نگهداری گردید. ریزنمونه‌هایی به اندازه ۷ × ۷ میلی‌متر از قسمت‌های قاعده هر فلس جدا شد و روی محیط کشت‌های تغییر یافته موراشیگ و اسکوگ (MS) (Murashige and Skoog 1962) کشت گردید. طبق غلظت‌های ذکر شده در جدول ۱، تیمارهای مختلف فسفر ، پتاسیم و کلسیم بصورت نسبتی از غلظت استاندارد (۱) محیط کشت موراشیگ و اسکوگ تهیه گردید و در هر گروه از عناصر درشت مغذی با حذف (۰) و نصف شدن (۰/۵) و دو (۲) و سه (۳) برابر شدن هر عنصر، تاثیر آن عنصر مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۱. مقدار درشت مغذی های استفاده شده در محیط کشت های تغییر یافته MS

Table 1. Macro elements concentrations in modified MS media

نمک های جبرانی Compensation salts	**غلظت تغییر یافته** (mM) Adapted concentrations	**غلظت در محیط کشت** x MS x MS concentrations	**نمک مورد استفاده در** MS Salt used in MS	**درشت مغذی** Macro elements
-	0	0		
-	0.625	0.5		
-	1.25	1	KH_2PO_4	P
-	2.5	2		
-	3.75	3		
-	0	0		
-	9.395	0.5		
-	18.79	1	KNO_3	K
-	37.58	2		
-	56.37	3		
5.98 mM KCl	0	0		
2.99 mM KCl	1.495	0.5		
-	2.99	1	$CaCl_2$	Ca
-	5.98	2		
-	8.98	3		

محیط کشت MS شامل درشت مغذی‌های تغییر یافته به همراه ریز مغذی‌ها، ویتامین های مرسوم محیط کشت MS بهمراه ۳۰ گرم ساکارز در هر لیتر و ۰/۵میلی گرم در لیتر هورمون NAA و ۷ گرم آگار در هر لیتر بود. pH محیط کشت‌ها قبل از اضافه

کردن آگار تنظیم شده بود (pH= 5.8). ریز نمونه ها در ظروف پلاستیکی استریل حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط کشت به اندازه دهانه ۲/۵ سانتی متر و ارتفاع ۵ سانتی متر و به ازای هر ظرف یک ریزنمونه و به ازای هر تیمار ۳۰ ظرف مورد استفاده قرار گرفت. پس از کشت، نمونه‌ها در اتاقک رشد تحت دمای ۱±۲۴ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (Light= 30 µmol $m^{-2}s^{-1}$) و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. پس از ۱۲ هفته از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط‌های مورد نظر ویژگی‌هایی همچون درصد پیازچه‌زایی (۱۰۰ × کل ریزنمونه‌های هر تکرار/ تعداد ریزنمونه‌های دارای پیازچه باززایی شده هر تیمار)، تعداد پیازچه ، وزن‌تر اندام‌ها (پیازچه، برگ و ریشه) و وزن‌تر ریزنمونه فلس اندازه گیری شد. این پژوهش قالب کاملا تصادفی با ۳۰ تکرار انجام پذیرفت و در هر تکرار ۱ ریزنمونه کشت گردید. داده‌های حاصل از آزمایش به وسیله نرم افزار SAS (Version 9.0) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای توکی مورد مقایسه قرار گرفت.

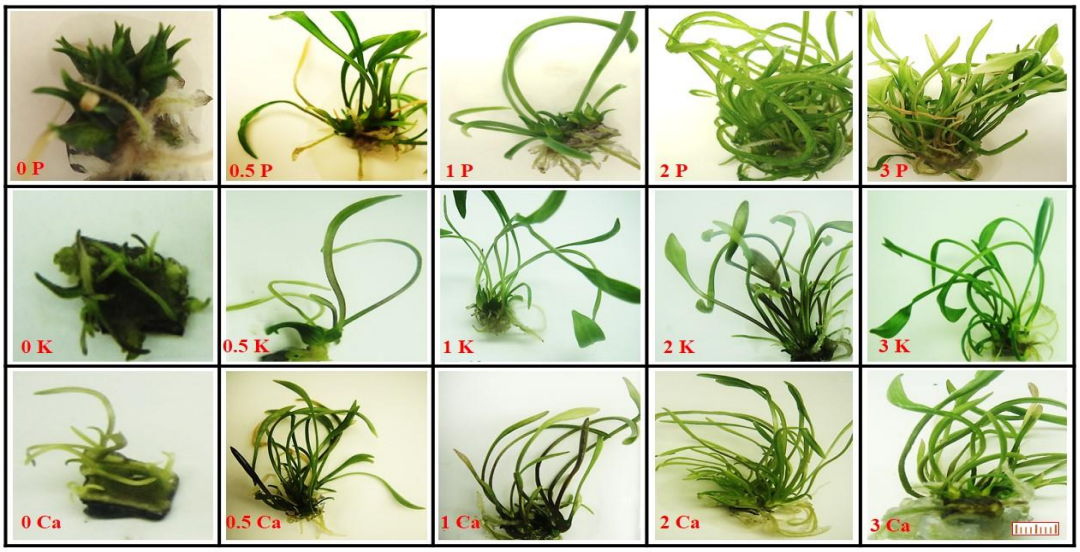
نتایج و بحث

درصد پیازچه زایی: بررسی روزانه نمونه‌ها به وضوح نشان داد که فقدان هر کدام از سه عنصر مورد نظر موجب بروز ناهنجاری‌های شدید و اختلال جدی در باززایی پیازچه گیاه سوسن گردید (شکل ۱). کم‌ترین درصد پیازچه‌زایی در تیمارهای فاقد عناصر مشاهده گردید و کم‌ترین آن در فقدان عنصر کلسیم مشاهده گردید. همچنین، در بین تیمارها بیش‌ترین درصد پیازچه‌زایی در تیمار ۲ برابر غلظت فسفر (۹۵/۳ درصد) ثبت گردید (شکل ۲).

تعداد پیازچه: با افزایش غلظت عناصر از صفر تا دو برابر غلظت پایه محیط کشت MS تعداد پیازچه در هر ریزنمونه بطور معنی‌داری افزایش پیدا می کند، اما در غلظت ۳ برابر هر کدام از عناصر تعداد پیازچه در هر ریزنمونه روند کاهشی به خود گرفت. در بین عناصر مورد استفاده، فسفر بیش‌ترین تاثیر را در افزایش تعداد پیازچه داشت بطوری‌که در تیمار دو برابر غلظت پایه با میانگین ۱۱/۶ پیازچه بیش‌ترین تعداد پیازچه مشاهده گردید (شکل ۳).

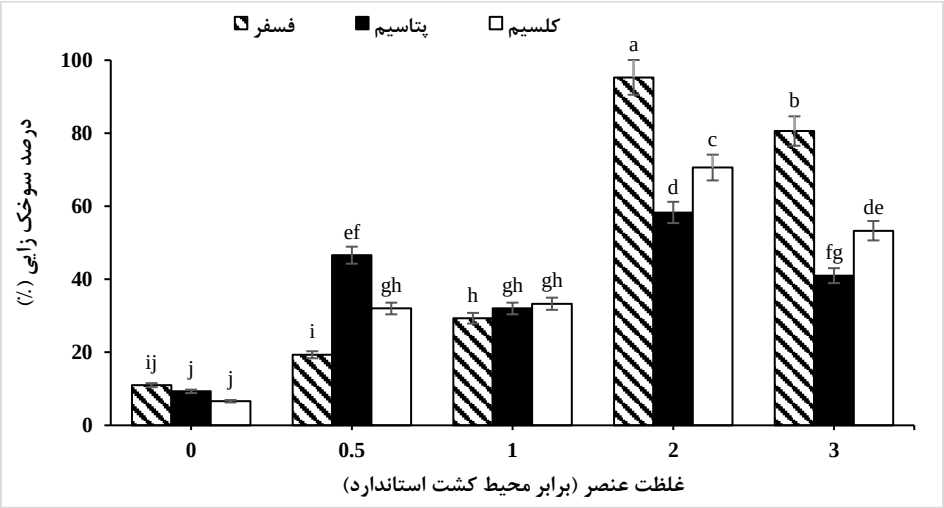
وزن‌تر پیازچه: بجز در تیمار ۳ برابر غلظت عناصر، با اضافه شدن غلظت عناصر وزن‌تر پیازچه بطور قابل توجهی افزایش یافت. با مقایسه اثر عناصر، بیشترین میزان وزن‌تر پیازچه در تیمارهای حاوی فسفر یافت شد، بطوری‌که در تیمار ۲ برابر غلظت فسفر با ۹۸ میلی گرم وزن‌تر در هر پیازچه بیش‌ترین تاثیر مشاهده گردید (جدول ۲).

وزن‌تر ریزنمونه: نتایج حاصل از جدول ۲ نشان داد پتاسیم کم‌ترین تاثیر را در رشد شاخص وزن‌تر ریزنمونه داشته است. همچنین، بیش‌ترین تاثیر با افزودن فسفر در محیط کشت حاصل شد. تیمار ۲ برابر غلظت فسفر موجب افزایش معنی‌دار وزن‌تر ریزنمونه (۱۳۷۷ میلی گرم در هر ریزنمونه) در مقایسه با سایر تیمارها گردید. با حذف عنصر کلسیم از محیط کشت میزان وزن‌تر ریزنمونه بطور معنی‌داری کاهش یافت، بطوری‌که کمترین میزان این شاخص با ۳۶/۳ میلی گرم در این تیمار ثبت گردید.



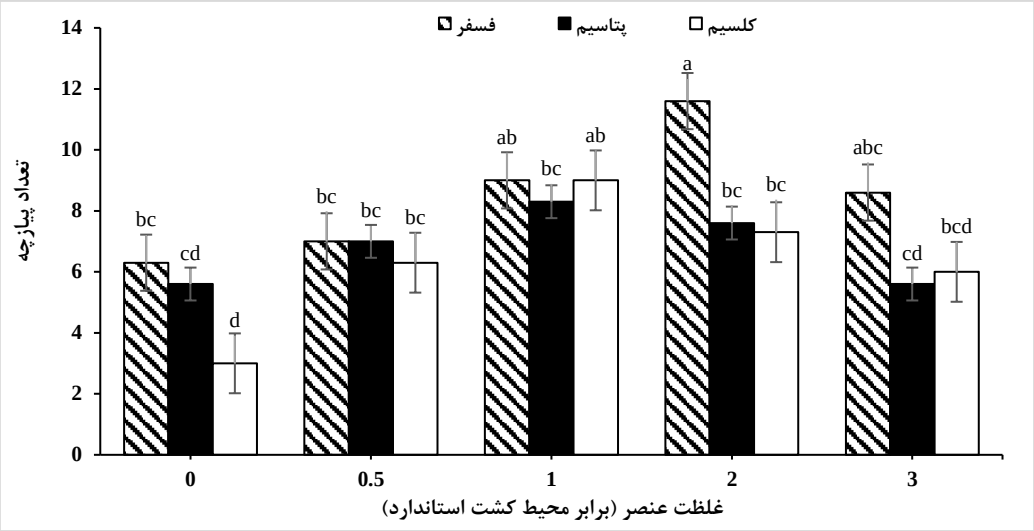
شکل ۱. وضعیت رشد پیازچه ها دوازده هفته پس از استقرار در محیط کشت های فاقد عناصر، نیم غلظت، پایه، ۲ و ۳ برابر غلظت پایه (به ترتیب از چپ به راست در هر ردیف) در گیاه سوسن

Figure 1. Appearance of *in vitro* lily bulblets growth 12 weeks after culture on medium; control, half-strength, basal, double and triple strength, in order from left to right (Bar scale size= 2cm)



شکل۲. تاثیر غلظت‌های مختلف فسفر، پتاسیم و کلسیم بر درصد پیازچه‌زایی سوسن در شرایط درون شیشه‌ای. مطابق آزمون توکی در هر ستون حروفی که متفاوت نیستند دارای اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند

Figure 2. Influences of phosphorous, potassium and calcium concentrations on lily *in vitro* bulblet regeneration percentage. Different letters within each column show significant differences according to Tukey's multiple-range test ($p \leq 0.05$)



شکل۳. تاثیر غلظت‌های مختلف فسفر، پتاسیم و کلسیم بر تعداد پیازچه‌های سوسن در شرایط درون شیشه‌ای. مطابق آزمون توکی در هر ستون حروفی که متفاوت نیستند دارای اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند

Figure 2. Influences of phosphorous, potassium and calcium concentrations on lily *in vitro* bulblet number. Different letters within each column show significant differences according to Tukey's multiple-range test ($p \leq 0.05$)

وزن‌تر برگ: بر اساس نتایج این پژوهش (جدول ۲) بین غلظت‌های مختلف فسفر تفاوت معنی‌داری در وزن‌تر برگ مشاهده گردید و بیش‌ترین میزان آن درتیمار ۲ برابر غلظت فسفر مشاهده گردید، اما با تغییرات غلظت پتاسیم و کلسیم تفاوت معنی‌داری در میانگین داده‌ها یافت نگردید.

وزن‌تر ریشه: با افزایش غلظت فسفر در محیط کشت وزن‌تر ریشه بطور قابل توجهی افزایش یافت و بیش‌ترین میزان آن در محیط‌های حاوی ۲ و ۳ برابر غلظت نرمال فسفر یافت شد، اما بین تیمارهای کلسیم و پتاسیم تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۲). پیازچه‌های باززایی شده از ریزنمونه فلس سوسن در شرایط درون شیشه‌ای غالبا به همراه تولید برگ و ریشه می باشد. در برخی از واریته‌ها پیازچه‌ها بدون برگ و و ریشه تولید می شوند (Askari and De Klerk 2020). همچنین در چرخه کشت بافت سوسن غالبا از پیازچه‌های درون شیشه‌ای به عنوان مواد اولیه کشت استفاده می شود. در طول چند دوره واکشت پیازچه‌ها و ازدیاد پیازچه‌ها به تدریج اندازه پیازچه‌ها کوچک می‌شوند. بطورکلی اندازه پیازچه‌های برون شیشه‌ای که با استفاده از روش‌های سنتی بدست می آید بزرگتر از پیازچه‌های درون شیشه‌ای است (Askari et al. 2022). از آنجایی‌که اندازه پیازچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای تاثیر مستقیمی روی عملکرد پیازچه‌ها در شرایط برون شیشه‌ای دارد، لذا فاکتور اندازه پیاز از اهمیت فراوانی بر خوردار است (Langens-Gerrits et al. 1997).

جدول ۲. تاثیر فسفر (P)، پتاسیم (K) و کلسیم (Ca) بر تعداد پیازچه، وزن‌تر (FW) اندام‌های سوسن (پیازچه، برگ و ریشه) و وزن‌تر ریزنمونه در شرایط دورن شیشه‌ای

Table 1. The effect of phosphorous (P), potassium (K) and calcium (Ca) on in vitro lily bulblet number and fresh weight (FW) of lily's organs (bulblet, leaf and root) and FW scale explant

وزن‌تر ریشه Root FW (mg/ explant)	وزن‌تر برگ Leaf FW (mg/ explant)	وزن‌تر ریزنمونه فلس Scale explant FW (mg/ explant)	وزن‌تر پیازچه Bulblet FW (mg/ bulblet)	غلظت Strength	درشت مغذی Macro elements
21 bc	56.3 d	201 f	23.3 ef	0	
113 ef	329.6 c	388.3 d	39.3 cd	0.5	
216 b	721.1 bc	793 b	70.3 b	1	P
249 a	1604.6 a	1377 a	98 a	2	
223.6 ab	1103.6 b	645.3 c	52.6 c	3	
52 g	21.6 d	57.6 h	20.6 f	0	
93.3 f	60.4 d	85.6 gh	46.6 cd	0.5	
101 f	281.6 c	205 ef	44cd	1	K
136.3 de	422.3 c	77.6 gh	37.3 de	2	
140 de	292.6 c	73.3 gh	23.6 ef	3	
10 h	16 d	36.3 h	19.6 f	0	
61 g	87 d	117 g	39 cd	0.5	
101.3 f	250 c	94.3 gh	50.3 cd	1	Ca
161 cd	184 d	236.3 ef	81.3 b	2	
171.6 c	162 d	263.3 e	47.4 cd	3	

مطابق آزمون توکی در هر ستون حروفی که تفاوتی ندارند دارای اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

Different letters within each column show significant differences according to Tukey's multiple-range test ($p \leq 0.05$).

بطوری‌که پیازچه‌های بزرگتر که در شرایط درون شیشه‌ای تولید شده اند دارای ساقه‌های با طول میانگره مناسب هستند، ولی پیازچه‌های کوچک به صورت روزت (پا کوتاه) رشد می‌کنند. در نتیجه ضروری است تا زمان بیش‌تری را برای رشد و نمو و رسیدن به اندازه بازار پ سند سپری کنند. همچنین م شاهده شده ا ست که پیازچه‌های با اندازه کوچک‌تر غالبا دارای مرحله خواب طولانی

هستند (Langens-Gerrits et al. 2003) و از آنجایی که برای تولید پیاز بازار پسند بخشی از مراحل رشد پیاز به دلیل هزینه زیاد تولید در کشت بافت در مزرعه انجام می گیرد بنابراین اندازه پیازچه حاصل از کشت بافت دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. معمولا انتقال مواد غذایی از محیط کشت بوسیله تراوش بر اساس قانون فیک برای مسیرهای کوتاه و برای مسیرهای طولانی‌تر با جریان توده‌ای در گیاه صورت می‌گیرد. که جریان توده‌ای ارتباط شدیدی با تبخیر و تعرق دارد که در شرایط درون شیشه‌ای بدلیل رطوبت بالای محیط درون شیشه ای بالاتر از ۹۰ درصد است و در نتیجه انتقال مواد با سرعت کمتری صورت می پذیرد و در پایان دوره‌های کشت بخشی از ترکیبات معدنی محیط کشت در آن بدون استفاده باقی می‌مانند (Askari et al. 2018). فسفر نقش حیاتی در فعالیت‌های سلولی نظیر حفظ ساختار غشای سلولی، ساخت مولکول‌های زیستی مهم (ATP, DNA, RNA)، سنتز پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم‌ها، فتوسنتز، استحکام ساقه و مهم‌تر از آن رشد و القای ریشه دارد (Malhotra et al. 2018). افزایش غلظت فسفر تا سطح دو برابر باعث افزایش معنی‌دار وزن‌تر پیازچه‌های باززایی شده داشت. همچنین درصد باززایی پیازچه، وزن‌تر برگ و ریشه و ریزنمونه فلس سوسن با افزایش غلظت تا سطح دو برابر موجب افزایش معنی‌دار نسبت به سایر غلظت‌ها گردید. نتایج منتشر شده از مطالعات پیشین در گیاه سوسن نیز نشان می‌دهد افزایش سطح فسفر قابل دسترس موجب بهبود رشد ریشه، تعداد پیازچه و وزن آن می‌گردد (Varshney et al. 2002) که این نتایج با داده‌های حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. بر اساس گزارشی جذب فسفر از محیط کشت در شرایط درون شیشه‌ای که به صورت $H_2PO_4^-$ صورت می گیرد با سرعت بیشتری نسبت به K^+ و Ca^{2+} جذب می شود (Pumisutapon 2012) لذا افزایش غلظت فسفر در محیط کشت احتمالا باعث افزایش جذب این عنصر نسبت به سایر عناصر می‌شود و در نتیجه باعث افزایش رشد پیازچه‌های سوسن نسبت به پتاسیم و کلسیم می شود.

پتاسیم در فعالیت‌های زیستی مهمی در گیاهان همچون فعالیت‌های روزنه‌ای، توسعه سلول، فعالیت غشاء سلولی، مقاومت در برابر تنش و رشد و توسعه سیستم ریشه‌ای مشارکت دارد (Sustr et al. 2019l; Behzadi Rad et al. 2021). همچنین، در مطالعات پیشین با هدف بهبود شاخص‌های تکثیر با روش سنتی به نقش مثبت استفاده از تیمارهای پتاسیمی در بهبود پارامترهای ریشه‌ای و افزایش تعداد برگ‌ها در گیاه سوسن به وضوح اشاره گردیده است (Barrera-Aguilar et al. 2013; Sahari Moghaddam et al. 2020) در پژوهش حاضر، بعد از عنصر فسفر، پتاسیم بیشترین تاثیر را در بهبود شاخص‌های ریشه‌ای و برگی داشت. از طرف دیگر، سرعت جذب پتاسیم محیط کشت در مقایسه با فسفر از سرعت کمتری بر خوردار بوده است (Pumisutapon 2012) و شاید به این دلیل افزایش غلظت پتاسیم در مقایسه با فسفر تاثیر کمتری بر روی رشد و باززایی پیازچه سوسن ایجاد کرده باشد. کلسیم نیز از عناصر مهم برای رشد گیاهان است و در فرایندهای مختلف گیاهی به‌ویژه تبخیر و تعرق موثر است (Rakesh et al. 2021). در این آزمایش افزایش غلظت کلسیم تا سطح دو برابر موجب افزایش وزن‌تر پیازچه‌های سوسن شد، اما روی رشد سایر اندام‌ها تاثیر مشخصی نگذاشت. قابل ذکر است کلسیم در بین سایر درشت مغذی‌ها کم‌ترین سرعت انتقال را از محیط کشت MS به ریزنمونه‌ها دارا می باشد (Pumisutapon 2012). لذا افزایش غلظت کلسیم

می‌تواند راهکاری برای افزایش جذب آن توسط ریزنمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای برای گیاهان حساس به کمبود کلسیم مانند پسته باشد که باعث سوختگی جوانه انتهایی می شود (Barghchi and Alderson 1996).

از یک سو، فقدان عناصر مورد مطالعه موجب اختلال شدید در شاخص‌های رشدی در ریزنمونه های مورد مطالعه شد. از سوی دیگر، افزایش بیش از اندازه هر کدام از عناصر (غلظت سه برابری نسبت به غلظت استاندارد) موجب کاهش چشمگیر در تمامی شاخص‌های اندازه‌گیری شد. طبق نتایج مطالعات پیشین، عدم جذب کلسیم سبب بروز مشکلات اساسی در سنتز پرولین، کلروفیل و در نتیجه کاهش معنی‌دار در وزن‌تر و خشک گیاه می‌شود (Xu et al. 2013). همچنین، محدودیت فسفر علاوه بر کاهش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و تثبیت نیتروژن، مانع از عملکرد صحیح فتوسنتزی شده و به نوبه خود موجب کاهش رشد گیاه می‌شود (Chen et al. 2013; Divito and Sadras 2014; Carstensen et al. 2018). کاهش رشد ناشی از فقدان پتاسیم را می‌توان به مختل شدن فعالیت‌های فتوسنتزی و روزنه‌ای، ممانعت از بیوسنتز پروتئین‌ها و کلروفیل‌ها و همچنین اختلال در روابط آبی نسبت داد (Zhao et al. 2001; Kanai et al. 2011; Hafsi et al. 2014). از دلالیل اصلی کاهش مجدد رشد در غلظت‌های بسیار بالای عناصر می‌توان به القای تنش اسمزی و ممانعت از جذب آب و عناصر مورد نیاز برای رشد و در نتیجه ایجاد اختلال در تعادل آبی و یونی اشاره کرد (Römheld 2012; Rizwan et al. 2021). در پژوهش حاضر، افزایش غلظت عناصر فسفر و کلسیم در کشت بافت موجب تولید بیش‌ترین تعداد پیازچه و بیش‌ترین وزن‌تر پیازچه شده است که می تواند در افزایش کیفیت پیازچه های بدست آمده در کشت بافت و در نتیجه کوتاه کردن طول دوره تولید پیاز سوسن تاثیر شگرفی داشته باشد.

نتیجه‌گیری: هدف اصلی این پژوهش بررسی اثر عناصر کلیدی فسفر، پتاسیم و کلسیم در رشد درون شیشه‌ای پیازچه سوسن بود. فسفر نقش حیاتی در پیازچه‌زایی داشت و افزایش غلظت آن به ۲ برابر به افزایش معنی‌دار شاخص‌هایی همچون پاسخ به پیازچه‌زایی، تعداد پیازچه و وزن‌تر اندام‌ها (پیازچه، برگ و ریشه) گردید. همچنین نتایج آزمایش به وضوح نشان داد فقدان هر کدام از عناصر مورد بحث موجب اختلال در شاخص‌های مرتبط با پیازچه‌زایی و رشد در گیاه سوسن خواهد شد.

سپاسگزاری: از آقای مهندس نی پن فارغ التحصیل کارشناسی ارشد دانشگاه وخنینگن هلند به‌دلیل کمک در انجام پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین، نگارندگان این پژوهش بر خود لازم می‌دانند از داوران محترم به‌دلیل ارائه نظرات ساختاری و علمی که موجب بهبود کیفیت مقاله گردید نهایت تقدیر و تشکر را داشته باشند.

References

Askari N, Aliniaeifard S, Visser RGF (2022) Low CO2 levels are detrimental for in vitro plantlets through disturbance of photosynthetic functionality and accumulation of reactive oxygen species. Horticulturae 8, e44.

Askari N, De Klerk GJ (2020) Elimination of epidermal wax from explants increases growth in tissue culture of lily. Sci Hortic 274, 109637.

Askari N, Visser RGF (2022) The role of scale explants in the growth of regenerating lily bulblets in vitro. Plant Cell Tissue Organ Cult 149, 589–598.

Askari N, Visser RGF, de Klerk GJ (2016) Advantageous effects of mild abiotic stresses in lily cultured in vitro. Propag Ornam Plant 16, 130–136.

Askari N, Visser RGF, Klerk G De (2018) Growth of lily bulblets in vitro, a review. Int J Hortic Sci Technol 5, 133–143.

Askari N, Wang YG, de Klerk GJ (2014) In tissue culture of Lilium explants may become heavily contaminated by the standard initiation procedure. Propag Ornam Plants 14, 49–56.

Azeri FN, Öztürk G (2021) Microbulb and plantlet formation of a native bulbous flower, Lilium monodelphum M. Bieb, var. Armenum, through tissue culture propagation. Biotechnol Reports 32

Bahr LR, Compton ME (2004) Competence for in vitro bulblet regeneration among eight Lilium genotypes. Hort Sci 39,127–129.

Bairu MW, Stirk WA, van Staden J (2009) Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell. Tissue Organ Cult 98, 239–248.

Bakhshaie M, Khosravi S, Azadi P, et al (2016) Biotechnological advances in Lilium. Plant Cell Rep 35, 1799–1826.

Bala A, Sharma P, Dhiman SR, Gupta YC (2018) Effect of calcium nitrate on propagation of LA hybrid lilies through scaling. Indian J Hortic 75, 723–727.

Barghchi M, Alderson PG (1996) The control of shoot tip necrosis in Pistacia vera L. in vitro. Plant Growth Regul 20, 31–35.

Barrera-Aguilar E, Valdez-Aguilar LA, Castillo-González AM, et al. (2013) Potassium nutrition in Lilium: Critical concentrations, photosynthesis, water potential, leaf anatomy, and nutrient status. Hort Sci 48, 1537–1542.

Behzadi Rad P, Roozban MR, Karimi S, et al. (2021) Osmolyte accumulation and sodium compartmentation has a key role in salinity tolerance of pistachios rootstocks. Agriculture 11(8), e708.

Carstensen A, Herdean A, Schmidt SB, et al. (2018) The impacts of phosphorus deficiency on the photosynthetic electron transport chain. Plant Physiol 177(1), 271-284.

Chen R, Song S, Li X, et al. (2013) Phosphorus deficiency restricts plant growth but induces pigment formation in the flower stalk of Chinese kale. Hortic Environ Biotechnol 54(3), 243-248.

Divito GA, Sadras VO (2014) How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. Field Crop Res 156, 161-171.

Hafsi C, Debez A, Abdelly C (2014) Potassium deficiency in plants: effects and signaling cascades. Acta Physiologiae Plantarum 36(5), 1055-1070.

Kanai S, Moghaieb RE, El-Shemy HA, et al. (2011) Potassium deficiency affects water status and photosynthetic rate of the vegetative sink in green house tomato prior to its effects on source activity. Plant Sci 180(2), 368-374.

Langens-Gerrits M, Lilien-Kipnis H, Croes T, et al. (1997) Bulb growth in lily regenerated in vitro. Acta Hortic 430, 267–273.

Langens-Gerrits MM, Miller WBM, Croes AF, De Klerk GJ (2003) Effect of low temperature on dormancy breaking and growth after planting in lily bulblets regenerated in vitro. Plant Growth Regul 40, 267–275.

Malhotra H, Vandana, Sharma S, Pandey R (2018) Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. In: Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance. Springer Singapore, pp 171–190

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473–497.

Niedziela CE, Kim SH, Nelson PV, De Hertogh AA (2008) Effects of N-P-K deficiency and temperature regime on the growth and development of Lilium longiflorum “Nellie White” during bulb production under phytotron conditions. Sci Hortic 116, 430–436.

Pumisutapon P (2012) Apical dominance and growth in vitro of Alstroemeria. PhD Thesis, Wageningen University and research. pp. 17-31.

Rakesh B, Sudheer WN, Nagella P (2021) Role of polyamines in plant tissue culture: An overview. Plant Cell. Tissue Organ Cult 145, 487–506.

Römheld V (2012) Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. In Marschner's mineral nutrition of higher plants (pp. 299-312). Academic press.

Sahari Moghaddam A, Nasir SS, Moghaddam S, Nasir S (2020) Evaluation of the Effect of Different Potassium Concentrations in Nutrient Solution on Growth and Postharvest Life of Lily Flowers (Lilium spp.) in Hydroponic. J Ornam Plants 10, 253–262.

Sahoo MR, Devi MP, Dasgupta M, et al (2018) An efficient protocol for in vitro regeneration and conservation of Shirui lily (Lilium mackliniae Sealy): a lab-to-land approach to save the rare endangered Asiatic lily species. Vitr Cell Dev Biol - Plant 54, 701–710.

Saito S, Uozumi N (2020) Calcium-Regulated Phosphorylation Systems Controlling Uptake and Balance of Plant Nutrients. Front. Plant Sci 11, e44.

Sardans J, Peñuelas J (2021) Potassium control of plant functions: Ecological and agricultural implications. Plants 10, 1–31.

Seyedi N, Torkashvand AM, Allahyari MS, et al (2013) Investigating of the Effects of Calcium Concentration under Hydroponic Conditions on Quantitative and Qualitative Growth of Lilium ‘Tresor. J Ornam Plants 3, 19–24.

Shibli RA, Sawwan J, Swaidat I, Tahat M (2001) Increased phosphorus mitigates the adverse effects of salinity in tissue culture. Commun Soil Sci Plant Anal 32, 429–440.

Sustr M, Soukup A, Tylova E (2019) Potassium in root growth and development. Plants 8, e435.

Varshney A, Sharma MP, Adholeya A, et al. (2002) Enhanced growth of micropropagated bulblets of Lilium sp. inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi at different P fertility levels in an alfisol. J Hortic Sci Biotechnol 77, 258–263.

Yan-long Z, Qi-xiang Z, Xiao-na XUE (2010) The Effects of the Photoperiods on the Bulblet Formation and Sugar Metabolism Change of Wild Lilium lancifolium in Vitro. Acta Hortic Sin 6, 957 -962.

Xu C, Li X, Zhang L (2013) The effect of calcium chloride on growth, photosynthesis, and antioxidant responses of Zoysia japonica under drought conditions. PloS one 8(7), e68214.

Zhao D, Oosterhuis DM, Bednarz CW (2001) Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. Photosynthetica 39(1), 103-109.

Zhang J, Gai MZ, Xue BY, et al. (2017) The use of miRNAs as reference genes for miRNA expression normalization during Lilium somatic embryogenesis by real-time reverse transcription PCR analysis. Plant Cell Tissue Organ Cult 129, 105–118.

Zhang R, Li C, Fu K, et al. (2018) Phosphorus alters starch morphology and gene expression related to starch biosynthesis and degradation in wheat grain. Front Plant Sci 8, 2252.