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

Micropropagation and encapsulation-dehydration method for cryopreservation of *Fritillaria imperialis*

Shima Seydi

PhD Candidate, Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. E-mail: sh.seidi@ymail.com

Shahram Sedaghathoor

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. E-mail: sedaghathoor@yahoo.com

Behzad Kaviani

Associate Professor, Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. E-mail: b.kaviani@yahoo.com, Alternative E-mail: kaviani@iaurasht.ac.ir

Abstract

Objective

Fritillaria imperialis from the Liliaceae family is an ornamental species in danger of extinction. Therefore, it is nessessary to conserve the plant genetic pool. Two proper methods to access this goal are micropropagation and germplasm conservation in *in vitro* freezing conditions. The presence of suitable pre-treatments is necessary for cryopreservation. The most important and the most application of pre-treatment is encapsulation-dehydration. The purpose of current research was *in vitro* proliferation of *F. imperialis* using plant growth regulators and its cryopreservation using encapsulation-dehydration pre-treatment.

Materials and methods

Bulb scales as explants and MS medium as basic culture medium were used. For micropropagation, kinetin (Kin) and α-naphthaleneacetic acid in concentrations of 0 (as control), 0.5, 1 and 2 mg l^{-1} were applied. For cryopreservation, explants were pretreated with encapsulation-dehydration followed by conservation in liquid nitrogen. Encapsulation was done using sodium alginate. Dehydration was carried out in air and using high level of sucrose.

Results

The results of micropropagation showed that the maximum number of leaf (3.5) and root number (5.7) was obtained in explants treated with 0.5 mg l^{-1} Kin along with 1 mg l^{-1} NAA. The results of cryopreservation showed that encapsulation-dehydration in air as a pre-treatment had effective role on the survival and regeneration of explants (70.5%) after conservation in liquid nitrogen. Least explant survival was obtained in control (without pre-treatment). *In vitro* regenerated plantlets were cultivated in plastic pots containing peat moss and perlite (in ration of 1:1) and acclimatized with environmental conditions. The survival rate was 90% and the growth pattern of regenerated plants was similar to that of mother plants.

Conclusions

Present research proposes the use of 0.5 mg l^{-1} Kin together with 1 mg l^{-1} NAA for micropropagation and encapsulation-dehydration for germplam cryopreservation of *F. imperialis*. Micropropagation by direct and indirect organogenesis and embryogenesis is a proper approach for proliferation of ornamentals in danger of extiction. The success of these methods depends on type and concentrations of auxins and cytokinins applied in culture medium, singular or in combination. In order to protect rare and endangered ornamental species, modern biotechnological tools need to be utilized.

Keywords: Growth regulators, Liliaceae family, Endengered Plants, Germplasm conservation, *In vitro* culture.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Seydi Sh, Sedaghathoor Sh, Kaviani B (2021) Micropropagation and encapsulation-dehydration method for cryopreservation of *Fritillaria imperialis*. *Agricultural Biotechnology Journal* 13(2), 125-146.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (2), 125-146 DOI: 10.22103/jab.2021.16279.1251

Received: May 20, 2021. Accepted: June 24, 2021.

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

ریزازدیادی و روش کپسوله‌کردن-آب‌گیری برای حفاظت فراسرد گیاه لاله‌ی واژگون (*Fritillaria imperialis*)

شیما صیدی

دانشجوی دکتری علوم باغبانی، گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. رایانامه: sh.seidi@ymail.com

شهرام صداقت‌حور

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. رایانامه: sedaghathoor@yahoo.com

بهزاد کاویانی

دانشیار، گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. رایانامه: kaviani@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۳

چکیده

هدف: لاله‌ی واژگون (*Fritillaria imperialis*) از خانواده‌ی سوسنیان (Liliaceae)، یک گونه‌ی زینتی در معرض خطر انقراض است. تکثیر این گیاه در شرایط طبیعی، کارایی بالایی ندارد و زمان‌بر است. ریزازدیادی، یک فن مناسب برای تکثیر لاله‌ی واژگون در شرایط درون‌شیشه‌ای است. برای حفظ خزانه‌ی ژنتیکی این گیاه تهدیدشده، استفاده از فن حفاظت انجمادی ضروری است. برای حفاظت انجمادی، حضور پیش‌تیمارهای مناسب ضروری است. مهم‌ترین و پر استفاده‌ترین پیش‌تیمار، کپسوله‌کردن-آب‌گیری است. هدف از پژوهش حاضر، تکثیر درون‌شیشه‌ای لاله‌ی واژگون با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و حفاظت انجمادی آن با استفاده از پیش‌تیمار کپسوله‌کردن-آب‌گیری بود.

مواد و روش‌ها: فلس‌های سوخ به‌عنوان ریزنمونه و محیط کشت MS به‌عنوان محیط کشت پایه استفاده شدند. برای ریزازدیادی، کینتین (Kin) و نفتالین استیک اسید (NAA) در غلظت‌های صفر (به‌عنوان شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. برای حفاظت انجمادی، ریزنمونه‌ها بعد از پیش‌تیمار با روش کپسوله‌کردن-آب‌گیری، در ازت مایع نگهداری شدند. کپسوله-کردن با استفاده از آلژینات سدیم انجام شد. آب‌گیری در هوا و با استفاده از غلظت بالای سوکروز انجام گرفت.

نتایج: نتایج ریزازدیادی نشان داد که بیشترین تعداد برگ (۳/۵) و تعداد ریشه (۵/۷) در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. نتایج حفاظت انجمادی نشان داد که کپسوله‌کردن–آب‌گیری در هوا به‌عنوان یک پیش‌تیمار، نقش مؤثری در بقا و قدرت جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها (۷۰/۵ درصد) بعد از نگهداری در ازت مایع داشت. کمترین بقای ریزنمونه مربوط به ریزنمونه‌های شاهد (بدون پیش‌تیمار) بود. گیاهچه‌های باززایی‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، درون گلدان‌های حاوی پیت موس و پرلایت (به نسبت ۱:۱) کاشته شدند و با شرایط محیطی سازگار گردیدند. نرخ زنده‌مانی در گیاهچه‌های ریزازدیادی‌شده، ۹۰ درصد و الگوی رشد گیاهان باززایی‌شده شبیه گیاهان مادری بود.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر، استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA را برای ریزازدیادی و کپسوله‌کردن–آب‌گیری را برای حفاظت انجمادی ژرم‌پلاسم لاله‌ی واژگون پیشنهاد می‌کند. ریزازدیادی توسط اندام‌زایی و جنین‌زایی مستقیم و غیر مستقیم یک رویکرد مناسب برای تکثیر گونه‌های زینتی در حال انقراض است. موفقیت این روش‌ها به نوع و غلظت اکسین‌ها و سیتوکینین‌های به‌کار برده شده در محیط کشت، انفرادی یا در ترکیب با یکدیگر، بستگی دارد. به‌دلیل حفاظت از گیاهان زینتی در معرض خطر انقراض، نیاز است که روش‌های زیست‌فناوری نوین به کار برده شود.

کلیدواژه‌ها: تنظیم‌کننده‌ی رشد، خانواده‌ی سوسنیان، گیاهان در حال انقراض، ذخیره‌ی ژرم‌پلاسم، کشت درون‌شیشه‌ای.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: صیدی شیما، صداقت‌حور شهرام، کاویانی بهزاد (۱۴۰۰) ریزازدیادی و روش کپسوله‌کردن–آب‌گیری برای حفاظت فراسرد گیاه لاله‌ی واژگون (*Fritillaria imperialis*). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۲)، ۱۲۵–۱۴۶.

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

© the authors

مقدمه

لاله‌ی واژگون با نام علمی *Fritillaria imperialis* یک گیاه تک‌لپه‌ی پایا با ارزش زینتی و دارویی است که به‌صورت وحشی در برخی مناطق ایران رشد می‌کند (Hamidoghli et al. 2015). گل‌های این گیاه به‌صورت چتری از ۳ تا ۶ و گاهی تا ۸ گل سرنگون است که در بهار در انتهای ساقه‌ی آن باز می‌شوند. لاله‌ی واژگون دارای چندین براکته‌ی سبز برگ‌مانند است و گل آن به رنگ‌های سفید، زرد، نارنجی و قرمز دیده می‌شود. حضور طیف وسیعی از آلکالوییدها و گلیکوزیدها با خواص فیتوشیمیایی جالب در این جنس موجب استفاده از آن در داروسازی و درمان بیماری‌هایی از جمله بیماری‌های دستگاه تنفسی و قلبی–عروقی شده

است (Petrić et al. 2013; Çakmak et al. 2016). همچنین، گونه‌های این جنس به‌دلیل داشتن گل‌های زرد و قرمز جذاب که در اوایل بهار تولید می‌شوند، ارزش تجاری بسیار بالایی دارند (Mohammadi-Dehcheshmeh et al. 2006). در لاله‌ی واژگون، مقدار زیادی نشاسته وجود دارد که می‌تواند به‌عنوان یک منبع جدید نشاسته در صنایع دارویی و غذایی مورد بررسی قرار گیرد (Petrić et al. 2013). جنس لاله‌ی واژگون حدود ۱۰۰ گونه دارد که ۱۴ گونه‌ی آن بومی ایران هستند (Çakmak et al. 2016). جمعیت‌های وحشی این گیاه در ارتفاعات بخش‌های غربی ایران به‌ویژه در استان‌های ایلام، چهارمحال و بختیاری و کهکلویه و بویراحمد پراکنش دارند. لاله‌ی واژگون به‌دلیل بهره‌برداری زیاد و غیر قانونی گل (استفاده به‌عنوان یک گیاه گلدانی و شاخه‌بریده) و سوخ در فهرست قرمز انجمن بین‌المللی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی (IUCN 2016) قرار دارد. ریزازدیادی و حفاظت درون‌شیشه‌ای به‌ویژه حفاظت انجمادی (شرایط فراسرد)، دو روش مهم برای حفظ ژرم‌پلاسم گیاهان در خطر انقراض هستند.

نرخ تکثیر طبیعی لاله‌ی واژگون پایین است. سوخ‌های این گیاه در شرایط مناسب حدود ۶ سال طول می‌کشد تا به اندازه‌ای برسند که توانایی تشکیل گل را داشته باشند (Hamidoghli et al. 2015). تکثیر با روش‌های سنتی مانند قلمه‌زدن، استفاده از فلس سوخ و بذر به دلیل تولید تعداد کم سوخ، حضور کم سلول‌های مریستمی، خواب فیزیولوژیک بذرها و عدم شباهت کامل گیاهان حاصل از بذر با گیاهان مادری به‌دلیل دگر گرده‌افشانی، کارایی بالایی ندارد و زمان‌بر است (De Hertogh and Le Nard 1993; Petrić et al. 2013; Çakmak et al. 2016). این محدودیت‌ها عاملی برای یافتن روش‌های مؤثر دیگری است. یکی از مؤثرترین روش‌های تکثیر این گیاه، ریزازدیادی است. بسیاری از گیاهان زینتی در حال انقراض از جمله سوسن چلچراغ، شمشاد خزری، سرخدار و انواع ارکیدها با روش ریزازدیادی تکثیر می‌شوند (Kaviani 2020). گزارش‌هایی راجع به تکثیر درون‌شیشه‌ای گونه‌های مختلف لاله‌ی واژگون وجود دارد (Gao et al. 1999; Paek and Murthy 2002; Mohammadi-Dehcheshmeh et al. 2006; Joshi et al. 2007; Xue et al. 2008; Kizil and Khawar 2014; Kulkhanova et al. 2015; Kizil et al. 2016; Çakmak et al. 2016). تکثیر درون‌شیشه‌ای *F. imperialis* با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف از جمله فلس سوخ و هورمون‌های اکسینی مانند نفتالین استیک اسید (NAA)، ایندول بوتیریک اسید (IBA) و ایندول استیک اسید (IAA) و سیتوکینینی مانند بنزیل آمینوپورین (BAP)، تیدیازورون (TDZ) و بنزیل آدنین (BA) گزارش شده است (Witomska and Lukaszewska, 1997; Witomska, 2000; Rahimi et al., 2013, 2014). روش مورد استفاده‌ی ما برای ریزازدیادی لاله‌ی واژگون، اندام‌زایی غیر مستقیم با کاربرد غلظت‌های مختلف NAA و Kin بود (Rahimi et al., 2013). از غلظت‌های ۰/۱ تا ۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ترکیب با غلظت‌های ۰/۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin برای تکثیر درون‌شیشه‌ای گونه‌های مختلف *Fritillaria* غیر از *imperialis* استفاده شد (Okawa and Nishino 2000; Joshi et al. 2007; Xue et al. 2008). مطالعه روی باززایی مستقیم سوخچه از کشت فلس لاله‌ی واژگون (*F. imperialis*) در حضور IAA، TDZ، BA، Kin و NAA نشان داد که بالاترین میزان باززایی مستقیم (۸/۳۳ سوخچه)، بیشترین اندازه‌ی سوخچه (۲۶ میلی‌متر) و بیشترین تعداد ریشه (۸) در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر

NAA به‌دست آمد (Hamidoghli et al. 2015). در مطالعه‌ی ما، تعداد ریشه در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر اگرچه بیشترین نبود ولی مناسب بود. در *F. thunbergii* درصد بالایی از سوخچه، برگ و ریشه از کشت فلس سوخ در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (Paek and Murthy, 2002). مطالعه روی باززایی غیر مستقیم سوخچه‌ی لاله‌ی واژگون (*F. imperialis*) از کشت ریزنمونه‌های گلبرگ در محیط کشت B5 آشکار کرد که محیط غنی‌شده با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IAA مناسب بود (Mohammadi-Dehcheshmeh et al. 2006).

هر گیاه زینتی یک خزانه‌ی ژنتیکی با ارزش برای اصلاح است. گیاهان در معرض انواع خطرهای ناشی از شرایط نامساعد محیطی (زیستی و غیر زیستی) قرار دارند. این شرایط نامساعد می‌تواند منجر به حذف گیاهان از کره‌ی زمین، در نتیجه حذف خزانه‌ی ژنتیکی با ارزش شود. حفظ و نگهداری تنوع زیستی گیاهی برای برنامه‌های اصلاح گیاهی، استفاده در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی–آرایشی و مهندسی ژنتیک ضروری است (Kaviani 2021). گیاهان زینتی نقش قابل توجهی در تجارت جهانی دارند. برخی از گیاهان زینتی در خطر انقراض قرار دارند (Kaviani 2020). تلاش‌ها برای حفظ این گیاهان در حال انجام است. مؤثرترین روش حفاظت گیاهان، نگهداری ژرم‌پلاسم در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌ویژه حفاظت انجمادی یا فراسرد (نگهداری در ازت مایع) است (Panis and Lambardi 2005; Engelmann 2011; Kaviani 2020). به‌لیل تنش بالای حاصل از نگهداری ژرم‌پلاسم در دمای بسیار پایین ازت مایع، لازم است از پیش‌تیمارهای حمایتی استفاده شود. این پیش‌تیمارها، تنش حاصل از ازت مایع را بر سلول‌های گیاهی، کاهش می‌دهد. از بین این پیش‌تیمارها می‌توان به خشک‌کردن در هوا (Engelmann 2011)، آب‌گیری با استفاده از انجماد و مواد شیمیایی (González-Arnao et al., 2014)، کاربرد ترکیبات نفوذکننده و نفوذناپذیر به درون سلول (Panis and Lambardi 2005)، متابولیسم سازگارکننده (Panis 2019)، کپسوله‌کردن–آب‌گیری (Ozden-Tokatli et al. 2008)، شیشه‌ای‌کردن (Matsumoto 2017)، صفحات انجمادی (Yamamoto et al. 2011; Wang et al. 2020)، خشک‌کردن بسیار سریع و انجماد آهسته (Kaviani 2011; Panis 2019) اشاره کرد. از بین این روش‌ها، بیشترین کاربرد را روش کپسوله‌کردن–آب‌گیری (به‌ویژه برای گیاهان زینتی) و کپسوله‌کردن–شیشه‌ای‌کردن دارند (Panis and Lambardi 2005; Kulus and Zawleska 2014; Wang et al. 2020; Kaviani 2021).

فن کپسوله‌کردن–آب‌گیری، بر اساس فن‌آوری بذر مصنوعی توسعه یافته است. ایجاد پوشش در اطراف ریزنمونه‌های گیاهی (کپسوله‌کردن یا ایجاد بذر مصنوعی یا تیله)، به‌عنوان یک حمایت‌کننده‌ی مؤثر در برابر تنش ناشی از نگهداری در شرایط سرد و فراسرد معرفی شده است. کپسوله‌کردن همچنین برای حمایت مستقیم طی آب‌برداری و ذوب‌کردن نیز استفاده می‌شود. بذرهای مصنوعی با حضور آلژینات سدیم و کلرید کلسیم در محیط‌های کشت تولید می‌شوند. مواد گیاهی در تیله‌های آلژینات (عمدتاً آلژینات سدیم با غلظت ۳ درصد) کپسوله می‌شوند، در محیط مایع غنی‌شده با سوکروز (عمدتاً با غلظت ۰/۱ تا ۰/۷۵ مولار به‌مدت چند ساعت

یا چند روز) پیش‌کشت می‌شوند و به‌طور فیزیکی در جریان هوای تمیز یک هود لامینار فلو یا روی سیلیکاژل (عمدتاً ۲ تا ۶ ساعت) خشک می‌گردند (مقدار رطوبت نمونه حدود ۲۰ درصد) سپس به‌سرعت در ازت مایع غوطه‌ور می‌شوند (Cruz-Cruz et al. 2013; Kaviani 2021). تیله‌های آلژینات از نمونه‌های خشک‌شده، در برابر تنش‌های مکانیکی و اکسیداتیو در طی نگهداری حمایت می‌کند و دستکاری ریزنمونه‌های کوچک را آسان می‌نماید (Teixeira da Silva et al., 2014). حضور سوکروز یا قند–الکل‌هایی مانند مانیتول و سوربیتول، دستکاری را بسیار آسان‌تر و روش را امن‌تر و ارزان‌تر می‌کند (Kulus and Zalewska, 2014). حضور سوکروز در کپسول، علاوه بر آب‌گیری، باززایی سریع‌تر ریزنمونه‌ها را تحریک می‌کند (Ozden-Tokatli et al., 2008). حفاظت انجمادی با استفاده از فن کپسوله‌کردن–آب‌گیری برای انجماد سرشاخه‌های برخی گیاهان زینتی و بذرها، پروتوکورم‌ها و اجسام شبه‌پروتوکورم ارکیدها گزارش شده است (Khoddamzadeh et al., 2011; Kaviani 2020, 2021). نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم گیاهی با استفاده از روش انجماد تنها در صورتی موفقیت‌آمیز خواهد بود که از تشکیل کریستال‌های یخ درون سلول ممانعت به‌عمل آید (Wesley-Smith et al. 1998). مطالعات زیادی روی نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهان مختلف از جمله گیاهان زینتی در شرایط انجماد یا فراسرد انجام شده است (Panis and Lambardi 2005; Kaviani 2011; Kulus and Zawleska 2014). برخی از این مطالعات روی حفاظت انجمادی گیاهان زینتی قرارگرفته در لیست قرمز انجمن حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی بوده است (Kulus and Zawleska 2014; Kaviani 2020, 2021). در همه‌ی این مطالعات، هدف اصلی، پیداکردن راه‌های مناسب برای بقای نمونه‌های گیاهی نگهداری‌شده در ازت مایع و باززایی بیشتر آنها بعد از نگهداری و در هنگام کشت در محیط کشت است.

در ایران دو گونه از لاله‌ی واژگون (*F. imperialis* و *F. persica*) وجود دارد که بر اساس سیاست‌های سازمان حفاظت محیط زیست به‌عنوان ذخیره‌ی ژنتیکی و عنصر زیبایی‌شناختی قلمداد شده و بنا به دلایلی که پیش از این ذکر گردید، نیاز به حفاظت دارند. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر غلظت‌های مختلف Kin و NAA بر ریزازدیادی و اثر پیش‌تیمارهای آب‌گیری فیزیکی و شیمیایی و کپسوله‌کردن–آب‌گیری بر حفاظت انجمادی لاله‌ی واژگون در شرایط درون‌شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش: این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹۸–۱۳۹۷ در موسسه‌ی تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم کشاورزی هیرکان واقع در شهرستان آمل استان مازندران به مرحله‌ی اجرا در آمد. آزمایش‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد.

منبع گیاهی: سوخ‌های لاله‌ی واژگون (*F. imperialis*) از زیستگاه طبیعی این گیاه واقع در منطقه‌ی حفاظت‌شده‌ی مانشت و قلارنگ (با ارتفاع ۱۸۰۰–۲۲۰۰ متر از سطح دریا و با شیب ۶۰–۳۰ درصد جهت شمالی) در ارتفاعات زاگرس در استان ایلام (بین ۳۱ درجه و ۵۸ دقیقه تا ۳۴ درجه و ۱۵ دقیقه‌ی عرض شمالی نسبت به استوا و ۴۵ درجه و ۴۴ دقیقه تا ۴۸ درجه و ۱۰

دقیقه‌ی طول شرقی نسبت به نصف‌النهار گرینویچ) تهیه شدند (شکل ۱A). این سوخ‌ها به آزمایشگاه کشت بافت منتقل گردیدند و به عنوان مواد اولیه برای آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

ضدعفونی نمونه‌های گیاهی و تهیه‌ی ریزنمونه: نمونه‌های گیاهی به‌مدت یک ساعت در ظرفی حاوی آب شهری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی قرار داده شدند تا به خوبی شسته شوند و سپس به مدت نیم ساعت آبکشی گردیدند. سوخ‌های تمیز به‌مدت ۲۰ دقیقه با قارچ‌کش (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر بنومایل همراه با کاربندازیم) تیمار شدند و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر آبکشی گردیدند. سوخ‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۰/۰۱ گرم بر لیتر کلرید جیوه و بعد از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد قرار داده شدند، سپس ۳ بار با آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند. در نهایت، نمونه‌ها به‌مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند. بعد از ۳ بار شستشوی کامل با آب مقطر استریل در زیر هود، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا خشک شوند. سوخ‌ها به‌صورت عمودی به قطعات ۱۰ در ۱۰ میلی‌متر بریده شدند (شکل ۱B) و به‌عنوان ریزنمونه برای آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱C).

محیط کشت و تیمارهای مورد استفاده در ریزازدیادی: محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت پایه‌ی MS (Mureshige and Skoog, 1962) با ۳ درصد سوکروز و ۰/۸ درصد آگار بود. میزان اسیدیته (pH) محیط کشت قبل از اتوکلاو روی ۵/۸–۵/۶ تنظیم گردید. Kin و NAA در غلظت‌های صفر (به‌عنوان شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، به‌صورت انفرادی و یا در ترکیب با یکدیگر، مورد استفاده قرار گرفتند. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای $121^{o}C$ و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند.

پیش‌تیمارهای مورد استفاده در حفاظت انجمادی: ۱- فلس‌های سوخ بعد از ضدعفونی سطحی مستقیماً در ازت مایع قرار داده شدند (شاهد)؛ ۲- فلس‌های سوخ بعد از ضدعفونی سطحی به‌مدت ۲ ساعت در جریان هوای تمیز هود لامینار فلو آب‌گیری شدند (آب‌گیری فیزیکی)؛ ۳- فلس‌های سوخ بعد از ضدعفونی سطحی به‌مدت ۲ ساعت در محیط کشت مایع MS حاوی ۰/۷۵ مولار سوکروز آب‌گیری شدند (آب‌گیری شیمیایی)؛ ۴- فلس‌های سوخ بعد از ضدعفونی سطحی به‌مدت ۲ ساعت در محیط کشت مایع MS حاوی ۰/۷۵ مولار سوکروز آب‌گیری شدند (آب‌گیری شیمیایی)، سپس به‌مدت ۲ ساعت در جریان هوای تمیز هود لامینار فلو آب‌گیری شدند (آب‌گیری فیزیکی)؛ ۵- فلس‌های سوخ بعد از ضدعفونی سطحی به محیط کشت مایع MS حاوی ۰/۷۵مولار سوکروز و سه درصد آلژینات سدیم منتقل شدند و مدت یک ساعت در این محیط ماندند. سپس فلس‌های سوخ به‌صورت انفرادی و توسط پنس از این محیط به محیط کشت مایع MS حاوی ۰/۷۵ مولار سوکروز و ۱۰۰ میلی‌مولار کربنات کلسیم ($CaCl_2$) منتقل شدند و مدت یک ساعت در این محیط ماندند. در این شرایط، دور هر فلس سوخ، پوشش (کپسول) تشکیل شد (شکل ۲A). کپسول‌های حاوی فلس‌های سوخ سپس به‌درون ظروف پتری شیشه‌ای با قطر ۹ سانتی‌متر بدون درب منتقل شدند و مجموعه‌ی

ظروف همراه با فلس‌های سوخ کپسوله‌شده در زیر جریان هوای تمیز هود لامینار فلو (شکل ۲B) به‌مدت یک ساعت آب‌گیری شدند (Kulus and Zawleska 2014).

نگهداری در ازت مایع و ذوب‌کردن: فلس‌های سوخ پیش‌تیمارشده و شاهد به‌درون تانک ازت مایع غوطه‌ور گردیدند. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در ازت مایع، نمونه‌های منجمدشده به‌سرعت به‌درون آب ۴۰ºC برای ۲ دقیقه منتقل شدند (Kulus and Zawleska 2014).

محیط کشت باززایی: محیط کشت مورد استفاده برای باززایی ریزنمونه‌های نگهداری‌شده در ازت مایع (شکل ۲C)، محیط کشت MS با ۳ درصد سوکروز، ۰/۸ درصد آگار و غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA (محیط مناسب باززایی به‌دست‌آمده از آزمایش ریزازدیادی) بود. میزان اسیدیته (pH) محیط کشت قبل از اتوکلاو، روی ۵/۸–۵/۶ تنظیم گردید. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ºC و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند.

شرایط نگهداری ریزنمونه‌ها: محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها، در اتاق رشد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، با جریان تراکم فتون فتوسنتزی ۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه، دمای ۱ ± ۲۴ºC و رطوبت نسبی ۸۰–۷۵ درصد نگهداری شدند.

صفات اندازه‌گیری‌شده: در آزمایش ریزازدیادی، پس از ۶۵ روز، تعداد برگ و تعداد ریشه‌ی تولیدشده به ازای هر ریزنمونه شمارش شدند. در آزمایش حفاظت انجمادی، درصد زنده‌مانی و جوانه‌زنی فلس سوخ بعد از نگهداری در ازت مایع در محیط باززایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. چنانچه علائم ظهور نوریشه یا نوساقه در ریزنمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای مشاهده شد، نشان از زنده‌مانی آنها تلقی شد (Kaviani and Negahdar 2017).

شرایط سازگاری گیاهچه‌ها: گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل شسته شده و به گلدان‌های پلاستیکی حاوی پیت موس و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ منتقل گردیدند. گلدان‌ها در یک گلخانه‌ی سازگاری با دمای ۲۲C–۲۶ºC روز و ۱۸C–۲۲ºC شب، رطوبت نسبی ۸۰ درصد، تراکم نوری ۸۰۰۰ لوکس و دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت با آبیاری دوره‌ای نگهداری شدند تا سازگاری انجام شود. آبیاری هر هفته یک‌بار با آب شهری و هر ۱۵ روز یک‌بار با محلول هوگلند انجام شد.

طرح آماری و تجزیه‌ی داده‌ها: آزمایش‌ها در قالب طرح آماری فاکتوریل بر پایه‌ی کاملاً تصادفی (RCD) در ۳ تکرار و تعداد ۴ فلس سوخ در هر تکرار به‌عنوان نمونه انجام شدند. بررسی کلی نمونه‌ها، هر ۲ هفته یک‌بار با مشاهده‌ی نمونه‌های رشدیافته درون ظروف کشت و اندازه‌گیری نهایی بعد از ۶۵ روز برای ریزازدیادی و بعد از ۹۰ روز برای حفاظت انجمادی بعد از خارج‌کردن نمونه‌ها از ظروف کشت انجام شد. واکشت در آزمایش ریزازدیادی، برای دو بار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ انجام شد. از آزمون LSD در سطح احتمال ۹۵ درصد برای مقایسه‌ی میانگین‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

اثر NAA و Kin بر ریزازدیادی: بعد از گذشت ۴۵ روز از کشت، کالوس روی فلس‌های سوخ تشکیل شد. برگ‌ها به‌روش اندام‌زایی غیر مستقیم از کالوس به‌وجود آمدند (شکل ۱D). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات متقابل معنی‌دار غلظت‌های مختلف NAA و Kin بر تعداد برگ و تعداد ریشه در سطح احتمال یک درصد ($p\leq$۰/۰۱) بود. جدول مقایسه‌ی میانگین صفات (جدول ۲) نشان داد که بیشترین تعداد کالوس (۷/۹۸ در ریزنمونه)، در فلس‌های کشت‌شده در محیط کشت غنی‌شده با یک میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد. محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر Kin با القای تعداد ۶/۳۳ کالوس در هر ریزنمونه مناسب بود، اگرچه اختلاف معنی‌داری با تیمار برتر داشت. بیشترین تعداد برگ (۳/۵ عدد در هر گیاه) (شکل ۱E) در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و کمترین تعداد آن (۱/۶۶ عدد در هر گیاه) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمد. نتایج نشان داد که همه‌ی ریزنمونه‌های تیمارشده با ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با همه‌ی غلظت‌های NAA دارای تعداد کمتری برگ بودند. در تیمارهای حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با یک و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بیش از ۳ برگ در هر گیاه تولید گردید (جدول ۲). نتایج آشکار کرد که محیط MS غنی‌شده با یک میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین تعداد ریشه (۵/۷) را در هر ریزنمونه القا کرد. در محیط‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیش از ۵ ریشه در هر ریزنمونه تولید شد. کمترین تعداد ریشه (۲/۸ و ۲/۹ در هر ریزنمونه) در تیمار شاهد و تیمار حاوی بالاترین غلظت از Kin و NAA به‌وجود آمد (جدول ۲). مشاهدات برای درک اثر سازگاری روی بقا و مورفولوژی گیاهچه‌های سازگارشده، بعد از ۳۰ روز انجام شد (شکل ۱F) . میزان بقای گیاهچه‌های باززایی‌شده‌ی قرارگرفته در گلخانه، حدود ۹۰ درصد بود و گیاهچه‌های سازگارشده تفاوت ظاهری قابل‌توجهی در مرحله‌ی رویشی با گیاهان مادری نداشتند (شکل ۱).

در پژوهش حاضر، استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin برای تولید بیشترین تعداد کالوس و هر دوی برگ و ریشه طی اندام‌زایی غیر مستقیم از کالوس مناسب بود. مهم‌ترین نقش بیولوژیک Kin در گیاهان، القای تقسیم سلولی و تمایز، القای تولید کالوس و باززایی نوشاخه از بافت کالوس است، که این فرآیندها همراه با استفاده از غلظت پایین یک اکسین تسریع می‌گردد. البته میزان موفقیت به عوامل زیاد دیگری از جمله گونه‌ی گیاهی و نوع ریزنمونه‌ی مورد استفاده بستگی دارد. مهم‌ترین نقش بیولوژیک NAA تحریک تولید ریشه‌ی نابجا روی نوشاخه یا قلمه در شرایط درون‌شیشه‌ای و برون‌شیشه‌ای، همچنین تمایز است.

جدول ۱. تجزیه‌ی واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و Kin روی تعداد برگ، تعداد ریشه و تعداد کالوس لاله‌ی واژگون در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 1. Analysis of variance of the effect of different concentrations of plant growth regulators NAA and Kin on leaf, root and callus number of *F. imperialis in vitro* conditions

تعداد کالوس	تعداد ریشه	تعداد برگ	درجه آزادی	منابع تغییرات
Callus number	Root number	Leaf number	df	S.o.V
6.67**	4.20**	4.58**	3	Kin
2.17*	1.40ns	0.70**	3	NAA
5.40**	1.82**	0.36**	9	Kin × NAA
0.55	0.554	0.099	32	خطا
17.75	18.00	12.10	-	ضریب تغییرات

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد. ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

** Significant at the 1% probability levels. ns Non-significant.

با توجه به هدف پژوهش حاضر، این دو تنظیم‌کننده‌ی رشد انتخاب شدند. انجام هر دوی فرآیندهای ساقه‌زایی و ریشه‌زایی در یک تیمار هورمونی از اکسین و سیتوکینین از نظر اقتصادی و زمانی حائز اهمیت است. Paek and Murthy (2002) نشان دادند که بیشترین تعداد برگ (با میانگین ۳ برگ از هر پیازچه) در *F. thunbergii* Miq. از کشت ریزنمونه‌ی فلس پیاز در محیط کشت غنی‌شده با ۱/۶۲ میکرومولار NAA در ترکیب با ۴/۶۵ میکرومولار Kin به‌دست آمد. این نتیجه با نتیجه‌ی به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر همخوانی دارد. غلظت‌ها و انواع سیتوکینین استفاده‌شده نقش مؤثری روی نمو پیازچه از فلس پیاز در *F. thunbergii* داشت (Paek and Murthy 2002). در *F. aurea* Schott بالاترین میزان باززایی شاخه (۶/۴۴ در هر پیازچه) در محیط کشت حاوی ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد (Kizil et al. 2016). بالاترین تولید برگ (۳/۵ در هر فلس پیاز) در پژوهش ما، با استفاده از غلظت‌های بالاتر Kin و NAA به‌دست آمد، که علت اصلی آن می‌تواند تفاوت در میزان درون‌زای هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی باشد. در *F. imperialis* بالاترین تعداد شاخه و ریشه به‌ترتیب در محیط‌های کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد (Rahimi et al. 2014).

جدول ۲. مقایسه‌ی میانگین اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و Kin روی تعداد برگ، تعداد ریشه و تعداد کالوس لاله‌ی واژگون در شرایط درون‌شیشه‌ای با کمک آزمون LSD

Table 2. Mean comparison of the effect of different concentrations of plant growth regulators NAA and Kin on leaf, root and callus number of *F. imperialis in vitro* conditions using LSD test

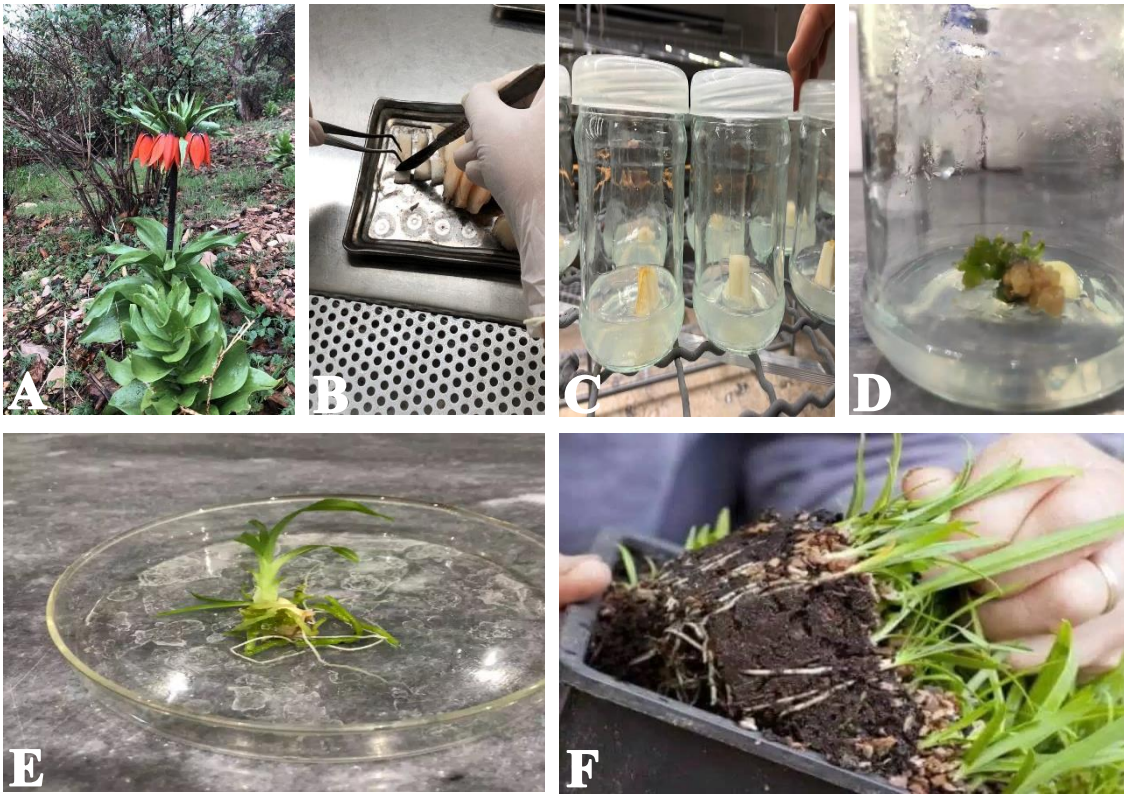
تعداد کالوس	تعداد ریشه	تعداد برگ	نفتالین استیک اسید (میلی‌گرم بر لیتر)	کینیتن (میلی‌گرم بر لیتر)
Callus number	Root number	Leaf number	NAA (mg l^{-1})	Kin (mg l^{-1})
$2.80^{ef} \pm 0.81$	$2.80^{h} \pm 0.23$	$2.65^{cd} \pm 0.01$	0.00	0.00
$3.90^{cde} \pm 0.64$	$3.23^{e–h} \pm 0.14$	$2.18^{ef} \pm 0.04$	0.50	0.00
$3.25^{e} \pm 0.46$	$3.70^{d–h} \pm 0.21$	$2.98^{c} \pm 0.01$	1.00	0.00
$3.23^{e} \pm 0.462$	$4.73^{abcd} \pm 0.28$	$2.50^{e} \pm 0.10$	2.00	0.00
$3.23^{e} \pm 0.68$	$4.40^{b–f} \pm 1.01$	$3.40^{ab} \pm 0.01$	0.00	0.50
$5.13^{bc} \pm 0.95$	$5.40^{ab} \pm 0.67$	$2.55^{e} \pm 0.21$	0.50	0.50
$7.98^{a} \pm 0.72$	$5.70^{a} \pm 1.43$	$3.50^{a} \pm 0.12$	1.00	0.50
$4.18^{cd} \pm 0.98$	$3.80^{c–h} \pm 0.75$	$3.42^{ab} \pm 0.14$	2.00	0.50
$6.33^{b} \pm 0.80$	$3.33^{f–h} \pm 0.45$	$2.55^{e} \pm 0.58$	0.00	1.00
$4.12^{cde} \pm 0.15$	$5.00^{abc} \pm 1.10$	$2.60^{de} \pm 0.44$	0.50	1.00
$4.74^{bcd} \pm 0.73$	$4.66^{a–e} \pm 0.82$	$2.40^{e} \pm 0.67$	1.00	1.00
$4.40^{cde} \pm 0.72$	$4.36^{b–f} \pm 0.54$	$2.20^{ef} \pm 0.40$	2.00	1.00
$4.86^{bcd} \pm 0.65$	$3.76^{d–h} \pm 0.12$	$1.96^{fg} \pm 0.05$	0.00	2.00
$4.22^{cde} \pm 0.80$	$4.10^{c–g} \pm 0.17$	$1.93^{fg} \pm 0.13$	0.50	2.00
$3.35^{de} \pm 0.83$	$3.70^{d–h} \pm 0.28$	$1.83^{g} \pm 0.34$	1.00	2.00
$3.67^{cde} \pm 0.77$	$2.90^{gh} \pm 0.15$	$1.66^{fg} \pm 0.13$	2.00	2.00

*** میانگین‌های با حروف متفاوت روی هر ستون در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای LSD به‌طور معنی‌داری متفاوتند.**

***Means with different letters on the same column are significantly different ($p<0.05$) based on LSD test.**

اکسین NAA در ترکیب با یک سیتوکینین، مؤثرترین اکسین برای القای پیازچه و رشد و نمو برگ و ریشه در لاله‌ی واژگون است (Paek, 1994). از غلظت‌های مختلف Kin، BA و NAA برای باززایی اندام‌ها با استفاده از فلس پیاز در *F. roylei* Hook استفاده شد.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۱. مراحل ریزازدیادی لاله‌ی واژگون. A) در زیستگاه طبیعی، استان ایلام؛ B) تهیه‌ی ریزنمونه‌های فلس سوخ ؛ C) قراردادن ریزنمونه‌ها در محیط کشت؛ D) تولید کالوس و اندام‌زایی غیرمستقیم از فلس‌های سوخ بعد از ۴۵ روز روی محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم بر لیتر NAA؛ E) گیاهچه‌ی کامل ایجادشده در شرایط کشت بافت بعد از ۶۵ روز روی محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم بر لیتر NAA؛ F) سازگاری گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط کشت بافت با شرایط برون‌شیشه‌ای ۳۰ روز بعد از خروج از ظروف کشت.

Figure 1. Micropropagation process of *F. imperialis*. A) At natural habitat, Ilam province; B) Preparation of bulb scale explants; C) Putting explants on culture medium; D) Callus production and indirect organogenesis from bulb scales after 45 days on culture medium containing 0.5 mg l^{-1} Kin together with 1 mg l^{-1} NAA; E) Full plantlet produced in tissue culture conditions after 65 days on culture medium containing 0.5 mg l^{-1} Kin together with 1 mg l^{-1} NAA; F) Acclimatization of plantlets produced in tissue culture conditions with *ex vitro* conditions, 30 days after exit from culture vessels.

بعد از گذشت ۸ هفته از کشت، بالاترین باززایی (۹۵/۸ درصد) در محیط کشت حاوی ۵ میکرومولار Kin و ۲ میکرومولار NAA به‌دست آمد (Joshi et al. 2007). بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰) و تعداد ریشه (۶/۳۵ در هر پیازچه) در *F. aurea* Schott در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد (Kizil et al. 2016)، که با نتایج حاصل از پژوهش ما همخوانی نداشت. در پژوهش ما، بیشترین تعداد ریشه (۵/۷ در هر فلس پیاز) در محیط حاوی هر دوی Kin و NAA به‌دست آمد. البته تعداد ریشه‌ی مناسب (۴/۷۳ در هر فلس پیاز) در محیط کشت حاوی NAA به‌تنهایی زمانی به‌دست آمد که از غلظت بالای این هورمون (۲ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. علت نتایج متفاوت را می‌توان در ژنوتیپ گیاه، شرایط رشد و میزان هورمون‌های درون‌زای آنها جستجو کرد. اثر غلظت‌های مختلف انواع اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر، بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی بسیاری از گیاهان نشان داده شده است (Soltanpour et al. 2018; Mohebodini and Fathi 2020).

اثر پیش‌تیمارها در حفاظت انجمادی: نتایج به‌دست‌آمده در این بخش از پژوهش نشان داد که کپسوله‌کردن–آب‌گیری در هوا نقش مؤثری در مقاومت فلس‌های سوخ در برابر تنش بالای ازت مایع داشت. نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات متقابل معنی‌دار پیش‌تیمارهای مختلف آب‌گیری و کپسوله‌کردن بر بقای ریزنمونه‌های حفاظت انجمادی شده در سطح احتمال یک درصد ($p\leq$۰/۰۱) بود. بالاترین درصد بقای ریزنمونه‌ها (۷۰/۵ درصد) مربوط به فلس‌های پیش‌تیمارشده با کپسوله‌کردن همراه با آب‌گیری در هوا بود. درصد بقا در ریزنمونه‌های پیش‌تیمارشده با کپسوله‌کردن همراه با آب‌گیری با ۰/۷۵ مولار سوکروز و کپسوله‌کردن همراه با آب‌گیری در هوا و آب‌گیری با ۰/۷۵ مولار سوکروز به‌ترتیب ۴۸/۷۶ و ۴۵/۵۰ درصد بود.

جدول ۳. تجزیه‌ی واریانس اثر پیش‌تیمارهای مختلف روی بقای لاله‌ی واژگون بعد از حفاظت انجمادی

Table 3. Analysis of variance of the effect of different pre-treatments on survival of *F. imperialis in vitro* after cryopreservation

Explants survival بقای ریزنمونه‌ها	df درجه آزادی	S.o.V منابع تغییرات
710**	3	Pre-treatment پیش‌تیمار
44.17	32	Error خطا
13.60	-	C.V. ضریب تغییرات

** **وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.**

** **Significant at the 1% probability levels**

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

کمترین بقای ریزنمونه‌ها (۱۸/۷ درصد) در فلس‌های سوخ شاهد (بدون اعمال هیچ پیش‌تیماری) مشاهده شد. آب‌گیری ریزنمونه‌ها در زیر جریان هوای تمیز هود لامینار فلو مناسب‌تر از آب‌گیری ریزنمونه‌ها در محلول حاوی غلظت بالای سوکروز و آب‌گیری زیر جریان هوای تمیز هود لامینار فلو همراه با آب‌گیری ریزنمونه‌ها در محلول حاوی غلظت بالای سوکروز بود (جدول ۴).

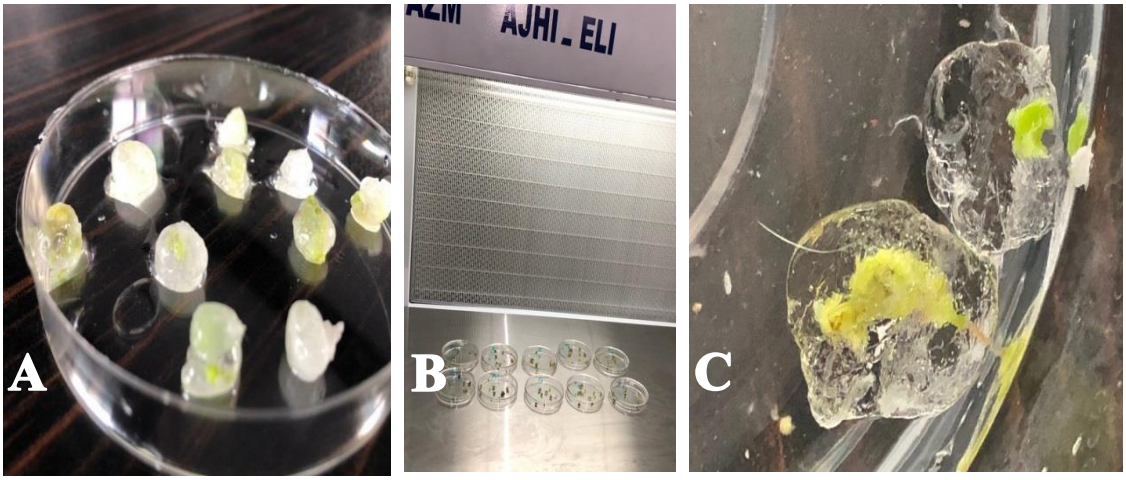
جدول ٤. مقایسه‌ی میانگین اثر پیش‌تیمارهای مختلف روی درصد جوانه‌زنی فلس سوخ لاله‌ی واژگون نگهداری‌شده در ازت مایع

Table 4. Mean comparison of the effect of different pre–treatments on germination percentage of *F. imperialis* bulb scale preserved in liquid nitrogen

Mean comparison مقایسه میانگین	Pre-treatments پیش‌تیمارها
جوانه‌زنی فلس سوخ (درصد) Germplasm germination (%)	
$18.70^{e} \pm 5.10$	Control شاهد
$57.30^{b} \pm 10.17$	Dehydration in air آب‌گیری در هوا
$38.20^{d} \pm 6.20$	Dehydration by sucrose آب‌گیری با سوکروز
$41.10^{c} \pm 8.18$	Dehydration in air and by sucrose آب‌گیری در هوا و آب‌گیری با سوکروز
$70.50^{a} \pm 12.53$	Encapsulation together with dehydration in air کپسوله‌کردن همراه با آب‌گیری در هوا
$48.76^{c} \pm 5.88$	Encapsulation together with dehydration by sucrose کپسوله‌کردن همراه با آب‌گیری با سوکروز
$45.50^{c} \pm 7.55$	Encapsulation together with dehydration in air and by sucrose کپسوله‌کردن همراه با آب‌گیری در هوا و آب‌گیری با سوکروز

میانگین‌های با حروف متفاوت روی هر ستون در سطح احتمال ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای LSD به طور معنی‌داری متفاوتند

Means with different letters on the same column are significantly different ($P < 0.05$) based on LSD test



شکل ۲. پیش‌تیمار فلس‌های سوخ لاله‌ی واژگون با روش کپسوله‌کردن–آب‌گیری قبل از قرارگیری در ازت مایع (A)؛ فلس‌های کپسوله‌شده‌ی در حال آب‌گیری فیزیکی زیر هود (B)؛ فلس‌های سوخ در حال رشد بعد از خارج‌کردن از ازت مایع (C).

Figure 2. Pre-treatment of *F. imperialis* bulb scales by encapsulation-dehydration method before plunging in liquid nitrogen (A); Encapsulated scales physical dehydrating under hood (B); Growing bulb scales after withdraw of liquid nitrogen (C).

کپسوله‌کردن ریزنمونه‌ها مقاومت آنها را در برابر تیمارهای تنش‌زا مانند آب‌گیری که می‌تواند برای ریزنمونه‌های کپسوله‌نشده بسیار آسیب‌رساننده یا حتی کشنده باشند، افزایش می‌دهد (Engelmann 2011). حضور آلژینات، مرحله‌ی آب‌گیری را کند می‌کند. روش کپسوله‌کردن–آب‌گیری یکی از پرکاربردترین و موفقیت‌آمیزترین پیش‌تیمارهای حفاظت انجمادی ژرم‌پلاسم گیاهان مختلف به‌ویژه گیاهان زینتی در حال انقراض است (Kaviani 2011; Khoddamzadeh et al. 2011; Kulus and Zalewska 2014). پژوهش حاضر نقش مؤثر کپسوله‌کردن–آب‌گیری در حفظ ژرم‌پلاسم گیاه لاله‌ی واژگون قرار داده شده در ازت مایع را نشان داد. یافته‌های مشابهی توسط برخی محققان روی تعدادی از گیاهان زینتی در حال انقراض گزارش گردید (Kaviani et al. 2008; Thammasiri 2008; Kaviani 2010, 2011; Khoddamzadeh et al. 2011; Subramaniam et al. 2011; Kulus and Zalewska 2014; Kaviani and Negahdar 2017). پیش‌تیمار کپسوله‌کردن–آب‌گیری باعث باززایی ۶۰ درصد از سرشاخه‌های حفاظت انجمادی شده‌ی شمشاد خزری (*Buxus* spp.) طی کشت در محیط باززایی شد (Kaviani and Negahdar 2017; Negahdar et al. 2021). در *Cyrtopodium hatschbachii* این پیش‌تیمار موجب بقای ۶۴ درصد بذرهای نابالغ بعد از نگهداری در ازت مایع گردید (Surenciski et al. 2012). در ارکید دندروبیوم (*Dendrobium* Walter Oumae *heterocarpum*, *D. nobile*, *D.* اجسام شبه‌پروتوکورم به‌عنوان ریزنمونه، قبل از حفاظت انجمادی،

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

کپسوله و آب‌گیری شدند. بعد از حفاظت انجمادی، به‌ترتیب ۸، ۵۳ و ۱۶ درصد از ریزنمونه‌ها در محیط باززایی جوانه زدند (Lurswijidjarusa and Thammasiri 2004; Pimda and Bunnag 2010; Mohanty et al. 2012). علت تفاوت در میزان باززایی، به تفاوت گونه‌ای و تفاوت در مدت زمان آب‌گیری برمی‌گردد. Khoddamzadeh و همکاران (2011)، ۴۷ درصد باززایی را در اجسام شبه‌پروتوکورم *Phalaenopsis bellina* پیش‌تیمارشده با فن کپسوله‌کردن–آب‌گیری بعد از حفاظت انجمادی گزارش کردند. مطالعه‌ی Kaviani و همکاران (2008) روی حفاظت انجمادی بذر سوسن چلچراغ، یک گونه‌ی زینتی در خطر انقراض، نشان داد که کپسوله‌کردن و آب‌گیری با سوکروز ۰/۶ مولار موجب بقای ۵۰ درصد از نمونه‌ها شد، در حالی که در مطالعه‌ی دیگر آب‌گیری به‌مدت یک ساعت در معرض جریان هوای تمیز هود لامینار فلو و یک ساعت با سوکروز ۰/۷۵ مولار سوکروز موجب بقای ۷۵ درصد از بذرها شد (Kaviani 2010). تعداد اندکی از گزارش‌ها نشان از عدم تأثیر کپسوله‌کردن روی حفاظت در برابر انجماد ژرم‌پلاسم دارد (Sakai et al. 2000; Kaviani 2011).

مقدار آب موجود در سلول‌ها نقش بحرانی در موفقیت یا عدم موفقیت حفاظت انجمادی دارد. حد بحرانی آب‌گیری برای هر گونه و رقم گیاهی باید تعیین شود. میزان آب‌گیری بیشتر از حد بحرانی، نمونه‌های گیاهی را به‌دلیل کم‌آبی و کمتر از حد بحرانی به‌دلیل تشکیل کریستال‌های یخی درون سلول‌ها از بین می‌برد (Panis and Lambardi 2005). آب‌گیری فیزیکی و شیمیایی (به‌ویژه استفاده از غلظت‌های بالای سوکروز) همراه با کپسوله‌کردن (کپسوله‌کردن–آب‌گیری) در ارتقای بقای ژرم‌پلاسم برخی گونه‌ها بعد از حفاظت انجمادی مؤثر بوده است (Kaviani 2011; Khoddamzadeh et al. 2011; Kulus and Zalewska 2014). حضور سوکروز در تیله‌ها، همچنین خشک‌کردن ریزنمونه‌ها تحت جریان هوای تمیز هود لامینار فلو، ریزنمونه‌ها را آب‌گیری می‌کنند و باززایی سریع‌تر آنها را در محیط کشت باززایی باعث می‌شوند (Kaviani 2011; Kulus and Zalewska 2014). زمان آب‌گیری و غلظت سوکروز در گونه‌های مختلف متغیر است. در پژوهش حاضر استفاده از غلظت ۰/۷۵ مولار سوکروز به‌مدت یک ساعت مناسب تشخیص داده شد. نتایج مشابه در برخی گونه‌ها مانند شمعدانی و داوودی گزارش شد (Kulus and Zalewska 2014). مطالعه‌ی حاضر نشان داد آب‌گیری در هوا نیز یک پیش‌تیمار فیزیکی مناسب است. نتایج مشابه در برخی گزارش‌ها وجود دارد (Kaviani 2011; Kaviani and Negahdar 2017; Panis 2019; Kaviani 2021). آب‌گیری در جریان هوای تمیز هود لامینار فلو نسبت به سایر روش‌های آب‌گیری فیزیکی آسان‌تر است و کاهش آب سریع‌تر اتفاق می‌افتد (Khoddamzadeh et al. 2011). در پژوهش حاضر، قدرت بقای ریزنمونه‌های پیش‌تیمارشده با هر دوی آب‌گیری فیزیکی (در هوا) و شیمیایی (با سوکروز) کمتر از قدرت بقای ریزنمونه‌های پیش‌تیمارشده با هر یک به‌تنهایی بود. نتایج مشابه در برخی گیاهان زینتی در حال انقراض گزارش شد (Kulus and Zalewska 2014; Kaviani 2021). روش کپسوله‌کردن–آب‌گیری به طور گسترده‌ای در حفاظت انجمادی ارکیدها با استفاده از بذر و اجسام شبه‌پروتوکورم مورد استفاده قرار گرفته است (Khoddamzadeh et al. 2011; Subramaniam et al., 2011). در پژوهش حاضر نیز بالاترین درصد باززایی بعد از حفاظت انجمادی فلس‌های سوخ لاله‌ی واژگون با پیش‌تیمار کپسوله‌کردن–آب‌گیری (در هوا) به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر، بیشترین تعداد برگ (۳/۵ برگ در هر ریزنمونه) و بیشترین تعداد ریشه (۵/۷ ریشه در هر ریزنمونه) در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. امروزه، به‌دلیل حمایت از تعداد زیادی گونه‌های زینتی به‌ویژه گونه‌های با ارزش در حال انقراض و افزایش خزانه‌ی ژنتیکی قابل دسترس، لازم است که ابزارهای بیوتکنولوژی مدرن به‌کار برده شوند. ریزنمونه‌ای که به‌خوبی مورد حمایت قرار گرفته باشد را می‌توان به‌مدت نامحدود در ازت مایع نگهداری کرد. با ترکیب فنون کشت بافت گیاهی و نگهداری در شرایط فراسرد، می‌توان یک بانک ژن گیاهی گسترده در یک فضای محدود ایجاد نمود. موفقیت رویکرد نگهداری ژرم‌پلاسم در شرایط فراسرد به عوامل متعددی از جمله تحمل مواد گیاهی به تنش اسمزی، تنش تغییر مواد شیمیایی، تنش خشکی و تنش انجماد بستگی دارد. نتایج حفاظت انجمادی نشان داد که کپسوله‌کردن-آب‌گیری به‌عنوان یک پیش‌تیمار، نقش مؤثری در بقا و قدرت جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها بعد از نگهداری در ازت مایع داشت و بیش از ۷۰ درصد ریزنمونه‌های منجمدشده طی کشت در محیط باززایی جوانه زدند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به خاطر همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

Çakmak D, Karaoğlu C, Aasim M et al. (2016) Advancement in protocol for *in vitro* seed germination, regeneration, bulblet maturation, and acclimatization of *Fritillaria persica*. Turk J Biol 40, 878–888.

Cruz-Cruz CA, González-Arnao MT, Engelmann F (2013) Biotechnology and conservation of plant biodiversity. Resources 2, 73–95.

De Hertogh AA, Le Nard M (1993) General chapter on summer flowering bulbs. pp. 741–774. In: De Hertogh AA, Le Nard M (eds.). The Physiology of Flowering Bulbs. Elsevier Amsterdam, London, New York, Tokyo.

Engelmann F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cell Dev–Biol Plant 47, 5–16.

Gao S, Zhu D, Cai Z et al. (1999). Organ culture of a precious Chinese medicinal plant – *Fritillaria unibracteata*. Plant Cell Tiss Org Cult 59, 197–201.

González-Arnao MT, Martinez-Montero ME, Cruz-Cruz CA, Engelmann F (2014) Advances in cryogenic techniques for the long-term preservation of plant biodiversity Maria Teresa. In: Ahuja MR, Ramawat KG (eds). Biotechnology and Biodiversity, Sustainable Development and Biodiversity, Springer International Publishing Switzerland, 129–170.

Hamidoghli S, Chamani E, Hamidoghli Y, Talei N (2015) Effect of different plant growth regulators on direct bulblet regeneration from scale expalnts of *Fritillaria imperialis*. J Crop Prod Proc 5 (16), 211–218.

IUCN (2016) The IUCN Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.

Joshi SK, Dhar U, Andola HC (2007) *In vitro* bulblet regeneration and evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. A high value medicinal herb of the Himalaya. Acta Hortic 756, 75–84.

Kaviani B (2020) Conservation of Ornamental Plants in Danger of Extinction by Biotechnology Methods. Islamic Azad Univ Press, Rasht Branch p. 178 (In Persian).

Kaviani B (2010) Cryopreservation by encapsulation–dehydration for long–term storage of some important germplasm: Seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axes of Persian lilac (*Melia azedarach* L.) and tea (*Camellia sinensis*). Plant Omics J 3 (6), 177–182.

Kaviani B (2011) Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. Aus J Crop Sci 5 (6), 778–800.

Kaviani B (2021) Cryobiomics in tropical and subtropical horticultural crops. In: Rout GR, Peter KV (eds). Omics in Horticultural Crops. Elsevier Publication (In Press).

Kaviani B, Safari-Motlagh MR, Padasht-Dehkaei MN et al. 2008 Cryopreservation of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.] germplasm by encapsulation-dehydration. Intl J Bot 4 (4), 491–493.

Kaviani B, Negahdar N (2017) Propagation, micropropagation and cryopreservation of *Buxus hyrcana* Pojark., an endangered ornamental shrub. South Afr J Bot 111, 326–335.

Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Lynch P et al. 2011 Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb. f.) Christenson by encapsulation-dehydration. Plant Cell Tiss Org Cult 107 (3), 471–481.

Kizil S, Khawar KM (2014) The effects of plant growth regulators and incubation temperatures on germination and bulb formation of *Fritillaria persica* L. Propag Ornam Plants 14, 133–138.

Kizil S, Sogut T, Sesiz U et al. (2016) Accelerated micropropagation of endemic *Fritillaria aurea* Schott. Sci Bull Series F Biotechnologies 20, 99–104.

Kulkhanova DS, Erst AA, Novikova TI (2015) In vitro regeneration from bulbous scales of *Fritillaria sonnikovae*, an endemic species. Russ J Dev Biol 46 (4), 215–221.

Kulus D, Zalewska M (2014) Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. Sci Hortic 168, 88–107.

Lurswijidjarus W, Thammasiri K (2004) Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium* Walter Oumae by encapsulation/dehydration. Sci Asia 30, 293–299.

Matsumoto, T., 2017. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. Rev. Agric. Sci. 5, 13–20.

Mohammadi-dehcheshmeh M, Khalighi A, Ebrahimie E et al. (2006) Direct bulblet regeneration from mature embryo: a rapid, efficient and genotype-independent in vitro morphogenesis pathway for preservation of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* and *Fritillaria persica*. HortSci 41, 1066–1066.

Mohanty P, Das MC, Kumaria S, Tandon P (2012) High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. Plant Cell Tiss Org Cult 109, 297–305.

Mohebodini M, Fathi R (2020) The effect of medium compounds on hairy root induction in chicory (*Cichorium intybus* L.) and enhancement of secondary metabolites. Agric Biotechnol J 12 (3), 67–90 (in Persian with abstract in English).

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473–479.

Negahdar N, Hashemabadi D, Kaviani B (2021) *In vitro* conservation of *Buxus sempervirens* L., a critically endangered ornamental shrub. Rus J Plant Physiol (In Press).

Okawa M, Nishino K (2000) Effect of sucrose and polyethylene glycol on leaf emergence, rooting and bulblet growth of *Fritillaria camtschatcensis* Ker-Gawl. *In vitro* culture. Environ Control Biol 38 (2), 99–103.

Ozden-Tokatli Y, De Carlo A, Gumusel F, Pignattelli S, Lambardi M (2008) Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental species. Propag Ornam Plants 8 (1), 17–22.

Paek KY (1994) Micropropagation of *Fritillaria thunbergii*. Research Report of Ministry of Science and Technology in Korea p 1–123.

Paek KY, Murthy HN (2002). High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. Plant Cell Tiss Org Cult 68, 247–252.

Panis B (2019) Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. Acta Hortic 1234, 1–7.

Panis B, Lambardi M (2005) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: The role of biotechnology. Villa Gualino, 5-7 March. 2005, Turin, Italy, 43–54.

Petrić M, Jevremović S, Trifunović M et al. (2013) The effect of low temperature and GA3 treatments on dormancy breaking and activity of antioxidant enzymes in *Fritillaria meleagris* bulblets cultured *in vitro*. Acta Physiol Plant 35, 3223–3236.

Pimda W, Bunnag S (2010) Cryopreservation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl. via encapsulation-dehydration method. Elba Bioflux 2 (1), 7–14.

Rahimi M, Daneshvar MH, Heidari M et al. (2014) Propagation and bulb formation of Fritillaria (*Fritillaria imperialis*) via *in vitro* culture. Intl J Plant Animal Environ Sci 4, 707–710.

Rahimi M, Daneshvar MH, Heigari M et al. (2013) *In vitro* micropropagation of *Fritillaria imperialis* L. through induction of indirect organogenesis. Intl J Agron Plant Prod 4 (3), 418–424.

Sakai A, Matsumoto T, Hirai D et al. (2000) Newly development encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. CryoLett 21 (1), 53–62.

Soltanpour M, Mahna N, Farsad Akhtar N (2019) Effects of different concentrations of plant growth regulators on callus induction and shoot regeneration in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). Agric Biotechnol J 10 (4), 75–92 (in Persian with abstract in English).

Subramaniam S, Sinniah UR, Khoddamzadeh A et al. (2011) Fundamental concept of cryopreservation using *Dendrobium* Sonia-17 protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration technique. Afr J Biotechnol 10 (19), 3902–3907.

Surenciski MR, Flachsland ED, Terada G, Mroginski LA, Rey HY (2012) Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. Biocell 36 (1), 31–36.

Teixeira da Silva JA, Zeng S, Galdiano RF, Dobránszki J, Cardoso JC, Vendrame WA (2014) *In vitro* conservation of *Dendrobium* germplasm. Plant Cell Rep 33, 1413–1423.

Thammasiri K (2008) Cryopreservation of some Thai orchid species. Acta Hort 788, 53–62.

Wang MR, Lambardi M, Engelmann F, Pathirana R, Panis B, Volk GM, Wang QC (2020) Advances in cryopreservation of *in vitro*-derived propagules: technologies and explant sources. Plant Cell Tiss Org Cult, Published online 19 February.

Wesley-Smith J, Walters C, Berjak P et al. (1998) A method for the cryopreservation of embryonic axes at ultra-rapid cooling rates. pp. 132-139. In: Marzalina M, Khoo K, Jayanthi N et al. (eds.). Recalcitrant seeds. Proceedings of the IUFRO Seed Symposium, 12–15 October 1998. Kuala Lampur, Malaysia. Intl Plant Germplasm Ins.

Witomska M (2000) The effect of the bulb storage temperature on the levels of soluble sugars, ABA and cytokinins and the *in vitro* regeneration of *Fritillaria imperialis* L. Problem Papers Progress Agric Sci 473, 335–341 (in Polish with abstract in English).

Witomska M, Lukaszewska A (1997) Bulblet regeneration *in vitro* from different explants of *Fritillaria imperialis*. Acta Hortic 430, 331–338.

Yamamoto S, Fukui K, Niino T (2011) A new cryopreservation method for vegetatively propagated plant genetic resources using aluminum cryo-plates. Dev Technol 10, 10–11.

Xue JP, Zhang AM, Geng ML et al. (2008). Study on bulblet induction of *Fritillaria anhuiensis in vitro*. China J Chinese Materia Medica 33 (22), 2603–2606.