Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Evaluation of regeneration potential of different layers of Amaryllis (*Hippeastrum* × *johnsonii*) bulb under influence of growth regulators

Mahdiyeh Kharrazi

*Corresponding Author, Faculty Member, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Khorasan Razavi, Iran, Tel: +989153259736, Email: ma_kh230@yahoo.com

Ali Tehranifar

Faculty Member, Department of Gardening, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Iran, Email: tehranifar@um.ac.ir

Ahmad Sharifi

Faculty Member, Department of Ornamental Plant Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Khorasan Razavi, Iran, Tel: +989151241822, Email: ahmadsharifi66@yahoo.com

Abdolreza Bagheri

Faculty Member, Department of Plant Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Iran, Email: abagheri@uma.cir

Abstract

Objective

Amaryllis is one of the ornamental bulbous plants, whose reproduction occurs slowly in natural conditions. Therefore, using tissue culture technique can be a suitable way to increase the multiplication rate of this ornamental plant.

Material and methods

In this study, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with 5 replications. The effect of different concentrations of BA and Kin (0, 0.5, 1 and 2 mg/L) in combination with 0.1 mg/L NAA on regeneration of different twin scale type of

amaryllis was evaluated. Explants were divided as twin scales and classified in 4 groups, so that the outermost twin scales was grouped in class 1 and the innermost twin scales was grouped in class 4.

Results

The results showed that the diameter of produced bulblet was influenced by the position of the twin scales in the mother bulb. The twin scale group one, which was made from the outer layers of the bulb, produced thicker bulblets, while the twin scales group four showed the minimum average of this trait. However, the explants cultured in a culture medium containing 0.5 mg/l BA in combination with 0.1 mg/l NAA had the highest bulblet diameter.

Conclusion

Generally, the application of twin scales group 1 and MS medium containing 0.5 mg/l BA in combination with 0.1 mg/l NAA is recommended for regeneration and proliferation of Amaryllis twin scale explants.

Key words: bulb diameter, BA hormone, culture medium, explants.

Citation: Kharrazi M, Tehranifar A, Sharifi A, Bagheri A (2019) Evaluation of regeneration potential of different layers of Amaryllis (*Hippeastrum* × *johnsonii*) bulb under influence of growth regulators. Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 1-18.

Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 1-18.
DOI: 10.22103/jab.2019.14419.1154
Received: October 23, 2019; Accepted: December 5, 2019
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

ارزیابی پتانسیل باززایی لایه‌های مختلف فلسی پیاز آماریلیس (*Hippeastrum* × *johnsonii*) تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف

سیده مهدیه خرازی

* نویسنده مسئول، عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، ایران، تلفن: 09153259736، ایمیل: ma_kh230@yahoo.com

علی تهرانی‌فر

عضو هیئت علمی گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، ایمیل: tehranifar@um.ac.ir

احمد شریفی

عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، ایران، تلفن: 09151241822، ایمیل: ahmadsharifi66@yahoo.com

عبدالرضا باقری

عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، ایمیل: abagheri@um.ac.ir

تاریخ دریافت: 1398/08/01 تاریخ پذیرش: 1398/09/14

چکیده

هدف: آماریلیس یکی از گیاهان زینتی پیازی است که تکثیر آن در شرایط طبیعی به کندی صورت می‌گیرد. لذا کاربرد تکنیک کشت بافت می‌تواند راهکار مناسبی جهت افزایش ضریب تکثیر این گیاه زینتی باشد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور آزمایشی بصورت فاکتوریل (4×2×4) و در قالب طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار و 5 مشاهده در هر تکرار طراحی گردید تا اثر غلظت‌های مختلف هورمون BA و Kin (0، 0/5، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA بر میزان باززایی ریزنمونه‌های مختلف فلس جفتی آماریلیس مورد ارزیابی قرار گیرد. ریزنمونه‌ها به 4 نمونه فلس جفتی

تقسیم و گروه‌بندی شدند، به‌طوری‌که در گروه یک، خارجی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی و در گروه چهار، داخلی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد که قطر پیازچه تولید شده تحت تأثیر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری قرار گرفت. فلس‌های جفتی گروه یک که از لایه‌های خارجی‌تر پیاز تهیه شده بودند، پیازچه‌های قطورتری را تولید نمودند، این در حالی است که فلس‌های جفتی گروه چهار، کمترین میانگین این صفت را به خود اختصاص دادند. از سوی دیگر ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه 0/1 میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA، بیشترین قطر پیازچه باززا شده را به خود اختصاص دادند.

نتیجه گیری: لذا کاربرد فلس جفتی گروه یک و محیط کشت MS حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه 0/1 میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA جهت تکثیر ریزنمونه‌های فلس جفتی آماریلیس توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: قطر پیازچه باززا شده، هورمون BA، محیط کشت، ریزنمونه.

مقدمه

گیاه آماریلیس[1]، یکی از گیاهان زینتی پیازی می‌باشد که در اکثر نقاط دنیا به عنوان یک گیاه با ارزش زینتی عرضه می‌شود. گیاهی است از خانواده آماریلیداسه[2] و جنس هیپستروم[3] (De Bruyn 1997). هیپستروم (آماریلیس) با داشتن ساقه گل دهنده بلند، گل‌های بزرگ و رنگارنگ به‌عنوان گیاه زینتی گلدانی، فضای باز و گل شاخه بریده پرورش داده می‌شود. امروزه نیز توجه زیادی به این گیاه می‌شود و در طی چند سال اخیر به‌عنوان یک گیاه پیازی زینتی مشهور در سطح بین المللی مطرح می‌باشد (Ye & Shi 2008). هلند و سایر کشورهای توسعه یافته گام‌های بلندی در اصلاح واریته‌های جدید و تکثیر تجاری این گیاه زینتی برداشته‌اند (Chakrabarty et al. 2007). اگرچه فرایند پرورش این گیاه طولانی (3 تا 4 سال طول می‌کشد تا گل دهد) و پر زحمت است، با این وجود پیاز آماریلیس نسبت به دیگر واریته‌های گیاهان گلدار کمیاب و تا حدی گران است (De Bruyn 1997). بنابراین با توجه به اهمیت این گیاه زینتی، پرورش آن چه برای فروش در بازار داخلی و یا خارجی، سود زیادی را برای تولیدکنندگان آن به همراه خواهد داشت. در رابطه با این گیاه زینتی، تکثیر زایشی یا تکثیر از طریق بذر جنبه تجاری نداشته و اغلب به منظور تولید ارقام جدید و یا برنامه‌های اصلاحی به کار می‌رود. همچنین مدت زمان لازم برای تولید گیاهان قابل عرضه آماریلیس از طریق کشت بذر، که توانایی گلدهی را داشته باشند، زیاد بوده و 3 تا 4 سال می‌باشد که تولید تجاری آماریلیس را با استفاده از روش تکثیر جنسی

1 . Amaryllis

2 . Amaryllidaceae

3 . Hippeastrum

محدود می‌کند. از سوی دیگر گیاهان تکثیر شده نیز شبیه گیاه مادری نیستند (Clemson 1995; Brown & Black 2007). همچنین برخی از هیبریدهای جدید این گیاه، تریپلوئید[4] و فاقد بذر می‌باشند (Seabrook & Cumming 1977).

تکثیر عمومی این گیاه با استفاده از روش‌های تکثیر غیرجنسی و تولید پیازچه‌های پاجوش انجام می‌گیرد. در شرایط طبیعی پیازهای آماریلیس فقط تعداد کمی پیازچه پاجوش تولید می‌کنند که از نظر تجاری روند کندی برای ازدیاد می‌باشد. به عبارتی هر پیاز تنها 2 تا 3 پیازچه در یک فصل رشد تولید می‌نماید (Dohare 1989). پیازچه‌ها پس از دو تا سه سال گل می‌دهند (Clemson 1995; Brown & Black 2007; De Bruyn 1997). البته برخی از ارقام نیز فاقد توانایی تولید پیازچه می‌باشند (Smith et al, 1999). بنابراین یکی از مهم‌ترین معایب تکثیر سنتی آماریلیس بازده پایین این روش تکثیر می‌باشد، به‌طوری‌که با احتساب تلفات پیازچه‌های تولید شده و همچنین با در نظر گرفتن این مسئله که در اغلب روش‌های تکثیر سنتی پیاز مادری نیز از بین می‌رود، به نظر می‌رسد تعداد پیازچه‌های تولید شده از هر پیاز بالغ، رقم قابل توجهی نباشد. همچنین در این روش‌ها، با توجه به شرایط تکثیر که رطوبت نسبی بالایی در محیط ازدیاد وجود دارد و حضور اجتناب ناپذیر زخم‌ها برای تحریک تکثیر رویشی، احتمال افزایش آلودگی‌های قارچی و باکتریایی وجود دارد که می‌تواند در هر دوره تکثیر بیشتر گردد و منجر به دژنره شدن[5] گیاه گردد. علاوه بر این تعداد پیازها یا قلمه‌های فلسی برش یافته که در تکثیر سنتی دچار پوسیدگی می‌شوند، زیاد می‌باشد.

در کنار روش‌های ازدیاد سنتی آماریلیس، روش‌های نوین تکثیر مانند روش‌های ازدیاد درون‌شیشه‌ای نیز وجود دارند. در این روش‌ها علاوه بر صرف زمان و هزینه کمتر، برخی مشکلات تکثیر سنتی از قبیل آلودگی‌ها و ضریب تکثیر کمتر را می‌توان برطرف کرد. طبق برخی از گزارش‌ها با استفاده از این روش‌ها ازدیاد آماریلیس را می‌توان به میزان زیادی افزایش داد (Seabrook & Cumming 1977; Witomska et al. 2008). نتایج پژوهشی بر روی گیاه آماریلیس نشان داد که تنها از یک ریزنمونه گلپایه (ساقه گل‌دهنده جوان) گیاه آماریلیس، می‌توان 114 عدد پیازچه در شرایط درون‌شیشه‌ای ایجاد کرد. به عبارتی از هر 2 میلی‌متر ریزنمونه گلپایه نزدیک به 6 عدد پیازچه تولید می‌گردد (Witomska et al. 2008). گزارشات حاکی از این است که بهترین ریزنمونه جهت کشت درون‌شیشه‌ای گیاه آماریلیس، فلس‌های جفتی و یا گلپایه جوان می‌باشند (Sharifi et al. 2010). استفاده از بافت گلپایه جوان دارای این مزیت است که پیاز مادری طی فرایند تکثیر از بین نمی‌رود، اما این نوع ریزنمونه همیشه در دسترس نیست. زیرا از ریزنمونه گلپایه زمانی باید استفاده نمود که گیاه در مرحله رشد رویشی فعال باشد (De Bruyn 1997).

در رابطه با تکثیر از طریق قلمه‌های فلسی، روش تکثیر با فلس جفتی نسبت به تک فلس متداول‌تر است (Alkema 1975; Hanks & Rees 1979). از سوی دیگر حضور بافت صفحه پایگاهی نقش مهمی در میزان باززایی ریزنمونه‌های فلسی دارد (Okubo 1993). در مطالعه‌ای اثر نوع ریزنمونه بر میزان باززایی پیاز گیاه آماریلیس[6] مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد

4. Triploid
5. Degeneration
6. *Hippeastrum* × *chmielii* chm.

که در ریزنمونه فلس جفتی، تولید پیازچه در محیط کشت فاقد هورمون نیز رخ می‌دهد، درحالی‌که در ریزنمونه گلپایه، تولید پیازچه تنها در صورتی اتفاق می‌افتد که محیط کشت حاوی هورمون BA و NAA باشد (Witomska et al. 2008). در تحقیق انجام شده بر روی گیاه نرگس (از خانواده آماریلیداسه)، گزارش گردید که افزایش نسبت هورمون سیتوکینین به اکسین جهت القاء تولید پیازچه از ریزنمونه‌های فلس جفتی مؤثر می‌باشد (Santos et al. 2002). طی پژوهشی Siddique et al. (2006) اثر اندازه ریزنمونه فلس جفتی و غلظت تنظیم کننده‌های رشد را بر کشت درون‌شیشه‌ای آماریلیس مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که بیشترین میزان تشکیل پیازچه در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با 0/5 میلی‌گرم در لیتر NAA و ریزنمونه فلس جفتی با طول 2/5 سانتی‌متر و عرض یک سانتی‌متر مشاهده شد. در پژوهش دیگری توانایی باززایی ریزنمونه‌های فلسی آماریلیس در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاربرد محیط کشت MS حاوی 4 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA همراه با 0/1 میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA جهت القای تشکیل پیازچه در ریزنمونه‌های فلسی مناسب می‌باشد. همچنین بهترین ترکیب هورمونی جهت پرآوری شاخساره‌ها، محیط کشت MS حاوی 5 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA در ترکیب با 0/1 میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA معرفی گردید (Aslam et al. 2012). در مطالعه انجام شده بر روی گیاه لیلیوم، کاربرد محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون کینتین به همراه 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA جهت القاء تولید پیازچه از نمونه‌های فلسی توصیه گردید (Lian et al. 2009). در پژوهش انجام شده بر روی گیاه لاله واژگون، محیط کشت حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA جهت تولید پیازچه از ریزنمونه های فلسی گیاه لاله واژگون انتخاب گردید (Rahimi et al. 2014). نتایج پژوهش Rice et al. (2011) بر روی گیاه برانسویجیا آندولاتا (از خانواده آماریلیداسه) نشان داد که اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر تعداد پیازچه باززا شده معنی‌دار نمی‌باشد. این در حالی است که نتایج مطالعه انجام شده بر روی گیاه *Eucrosia stricklandii* (از خانواده آماریلیداسه) بیانگر تأثیر معنی دار این پارامتر بر میزان باززایی پیازچه‌های دختری می‌باشد و داخلی‌ترین لایه‌های پیاز، پتانسیل بالاتری جهت باززایی ریزنمونه‌های فلسی از خود نشان دادند. از آنجا که تاکنون گزارشات اندکی مبنی بر تکثیر درون‌شیشه‌ای این گیاه زینتی در مقالات و منابع فارسی ارائه شده است و در عین حال تولید تجاری این گیاه زینتی حایز اهمیت می‌باشد، لذا تکثیر این گیاه در کشور با استفاده از روش‌های نوین تکثیر، راهی است تا بتوان در آینده‌ای نزدیک به تولیدکنندگان این گیاه زینتی با ارزش در جهت تولید انبوه این گیاه زینتی در ایران کمک نمود. از سوی دیگر با توجه به وجود گزارشات متفاوت در رابطه با ترکیب هورمونی محیط کشت و موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری، نیاز به بهینه‌سازی این عوامل جهت افزایش بازده تکثیر در شرایط این ویترو می‌باشد. لذا این آزمایش با هدف بررسی اثر غلظت‌های متفاوت هورمون BA و Kin بر باززایی ریزنمونه‌های فلسی تهیه شده از لایه‌های مختلف پیاز آماریلیس صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی مشهد انجام شد. پیازهای آماریلیس (*Hippeastrum* × *johnsonii*) بعد از خشک شدن قسمت‌های هوایی گیاه از گلخانه‌ای در شهرستان کاشمر جمع‌آوری گردیدند. پس از انتقال پیازها به آزمایشگاه به منظور ضدعفونی مواد گیاهی، ابتدا فلس‌های آسیب دیده و آلوده حذف گردیدند و سپس پیازها به مدت 30 دقیقه زیر آب جاری و چند قطره مایع‌شوینده رایج شستشو داده شدند تا گردوغبار و همچنین مواد زاید دیگر از سطح آن برطرف گردد. پس از این مرحله، از اتانول 70 درصد به مدت یک دقیقه برای از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی استفاده شد و پس از انتقال بشر حاوی پیازها به زیر هود لامینار و آبکشی با آب مقطر استریل، برای از بین بردن آلودگی‌های قارچی از محلول 1/5 درصد هیپوکلریت سدیم به مدت 30 دقیقه استفاده شد. به منظور کاهش کِشش سطحی و افزایش سطح تماس پیاز و ماده گندزدا، بسته به حجم محلول گندزدا 2 تا 3 قطره تِوین 20 به محلول ضدعفونی اضافه شد. طی مدت ضدعفونی و به منظور بهبود تماس گیاه با ماده گندزدا، محلول با دست تکان داده شد. در پایان مدت ضدعفونی، ریزنمونه‌ها تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار 3 مرتبه در بازه‌های زمانی 5، 10 و 15 دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. پس از اتمام شستشو، پیازها در داخل پتری دیش بر روی کاغذ صافی استریل شده، قرار گرفتند. فلس‌های خارجی پیازها که در مواجه با ماده گندزدا آسیب دیده بودند جدا و پیازها با استفاده از اسکالپل به صورت شعاعی به 12 قطعه‌ی مساوی برش داده شدند، به‌طوری‌که هر قطعه دارای بخش صفحه پایگاهی بود. سپس به منظور بررسی اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری، قطعات برش خورده به 4 نمونه فلس جفتی تقسیم و گروه بندی شدند، به‌طوری‌که در گروه یک، خارجی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی و در گروه چهار، داخلی‌ترین نمونه‌های فلس جفتی قرار گرفتند.

از محیط‌کشت جامد MS (Murashige & Skoog 1962) حاوی ترکیب‌های هورمونی BA و Kin هریک شامل 4 سطح (0، 0/5، 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA، 3 درصد ساکارز، 8 گرم در لیتر آگار، pH=5/7 استفاده شد. محیط کشت‌ها در ویال‌هایی به میزان 15 میلی‌لیتر توزیع گردیدند و به مدت 15 دقیقه در دمای 121 درجه سانتی‌گراد اُتوکلاو شدند. پس از کشت، ریزنمونه‌ها به شرایط نوری 16 ساعت روشنایی (2500-3000 لوکس) در دمای 1±25 درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. در پایان آزمایش صفاتی همچون ارتفاع گیاهچه، تعداد برگ، طول و تعداد ریشه، تعداد و قطر پیازچه باززایی شده اندازه‌گیری شد. این آزمایش بصورت آزمایش فاکتوریل (4×2×4) در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 عامل شامل نوع ریزنمونه (4 سطح)، نوع هورمون سیتوکینین (2 سطح) و غلظت هورمون سیتوکینین (4 سطح) با 3 تکرار و 5 مشاهده در هر تکرار، انجام شد.

شکل 1. موقعیت‌های مختلف فلس جفتی در پیاز مادری (به ترتیب از راست به چپ: فلس جفتی گروه 1، 2، 3 و 4)

Figure 1. Various positional of twin scales in mother bulb)Right-to-left respectively: twin scale group 1, 2, 3, and 4

آماده سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Jump 8 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد انجام شد و نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

اثر نوع هورمون سیتوکینین بر صفات مورد ارزیابی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر تأثیر معنی‌دار نوع هورمون بر تعداد و قطر پیازچه باززا شده بود (جدول 1). در محیط کشت حاوی هورمون BA، تعداد پیازچه بیشتری در مقایسه با محیط کشت حاوی هورمون Kin باززا گردید. همچنین قطر پیازچه‌های تولید شده در این محیط کشت نسبت به محیط کشت حاوی هورمون Kin بیشتر بود (جدول 2). در پژوهش انجام شده توسط Rahimi et al. (2014) نیز تأثیر متفاوت هورمون‌های BA و Kin بر باززایی فلس‌های پیاز لاله واژگون در شرایط درون شیشه‌ای گزارش گردید. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی هورمون BA نسبت به محیط کشت حاوی هورمون Kin، تعداد پیازچه بیشتری را تولید نمودند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. نتایج تحقیقات Han et al. (2004) بر تکثیر گیاه لیلیوم در شرایط درون شیشه‌ای نیز نشان داد که حضور هورمون BA در محیط کشت، تشکیل پیازچه از ریزنمونه‌های فلسی را افزایش می‌دهد.

اثر غلظت هورمون سیتوکینین بر صفات مورد ارزیابی: نتایج مندرج در جدول 3 نشان می‌دهد که تعداد پیازچه باززا شده تحت تأثیر غلظت هورمون سیتوکینین قرار گرفت. بیشترین تعداد پیازچه باززا شده در غلظت 2 میلی‌گرم در لیتر هورمون سیتوکینین حاصل شد. با این حال، از لحاظ تعداد پیازچه باززا شده تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های 1 و 2 میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد. همچنین غلظت هورمون سیتوکینین تأثیر معنی‌داری بر قطر پیازچه باززا شده داشت.

جدول 1. تجزیه واریانس اثر نوع و غلظت هورمون سیتوکنین و موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر میانگین مربعات صفات مورد ارزیابی

Table 1. Analysis of variance of the effect of type and concentration of cytokinin and twin scale position on the mother bulb on the mean squares of evaluated traits

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	تعداد پیازچه باززا شده No. of regenerated bulblet	قطر پیازچه باززا شده Diameter of regenerated bulblet	تعداد برگ تولید شده No. of produced leaf	ارتفاع گیاهچه باززا شده Height of regenerated plantlet	تعداد ریشه تولید شده No. of produced root	طول ریشه تولید شده Length of produced root
نوع هورمون type of (A) hormon	1	0.315 *	0.037 **	0.980 ns	0.078 ns	1.148 ns	0.150 ns
غلظت هورمون concentration of hormone (B)	3	0.313 **	0.042 **	0.160 ns	4.799 **	3.162 **	0.817 *
موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری twin scale position on the mother bulb (C)	3	0.135 ns	0.335 **	0.080 ns	3.472 **	6.106 **	2.324 **
نوع هورمون x غلظت هورمون A*B	3	0.105 ns	0.023 *	0.341 ns	0.557 ns	2.210 **	0.042 ns
غلظت هورمون x موقعیت فلس جفتی B*C	9	0.064 ns	0.002 ns	0.157 ns	0.476 ns	0.650 ns	0.360 ns
نوع هورمون x موقعیت فلس جفتی A*C	3	0.043 ns	0.003 ns	0.136 ns	0.724 ns	0.085 ns	0.161 ns
نوع هورمونx غلظت هورمونxموقعیت فلس جفتی A*B*C	9	0.033 ns	0.003 ns	0.072 ns	0.338 ns	0.046 ns	0.067 ns
خطا Error	64	0.072	0.008	0.324	0.544	0.531	0.245

****، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی دار.**

****, * and ns: significant at 1%, 5% and non-significant, respectively.**

جدول 2. اثر نوع هورمون سیتوکینین بر تعداد و قطر پیازچه باززا شده در کشت درون شیشه‌ای آماریلیس

Table 2. Effect of cytokinin type on number and diameter of regenerated bulblet during *in vitro* culture of Amaryllis

قطر پیازچه باززا شده (cm) Diameter of regenerated bulblet (cm)	تعداد پیازچه باززا شده No. of regenerated bulblet	نوع هورمون Type of hormone
0.74 [a]	1.15 [a]	BA
0.70 [b]	1.04 [b]	Kin

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different at probability level of 5% based on LSD test.

افزایش غلظت هورمون سیتوکینین از 1 به 2 میلی‌گرم در لیتر، منجر به کاهش قطر پیازچه‌های باززا شده گردید که از لحاظ آماری نیز تفاوت معنی‌داری را ایجاد نمود. بیشترین قطر پیازچه در محیط کشت فاقد هورمون سیتوکینین و کمترین میزان آن در محیط کشت حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر هورمون سیتوکینین مشاهده شد (جدول 3). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد در شرایطی که تعداد پیازچه کمتری تشکیل گردد، رقابت بین پیازچه‌ها بر سر جذب مواد غذایی کاهش می‌یابد و در نتیجه وزن پیازچه‌های تولیدی افزایش می‌یابد (Memar Mosharrafi et al. 2002). در پژوهش حاضر نیز، افزایش غلظت هورمون سیتوکینین منجر به افزایش تعداد پیازچه باززا شده گردید که به علت وجود رقابت بین پیازچه‌های تولیدی، قطر آن‌ها کاهش یافت. در پژوهش Santos et al. (2002)، افزایش نسبت هورمون سیتوکینین به اکسین در محیط کشت، جهت القاء تولید پیازچه‌های نرگس از ریزنمونه‌های فلس جفتی مؤثر گزارش شده است. در مطالعه‌ای دیگر، کشت ریزنمونه‌های فلس جفتی نرگس در محیط کشت حاوی هورمون NAA و کاربرد غلظت‌های بالای هورمون سیتوکینین منجر به تشکیل تعداد زیادی پیازچه (20 عدد) گردید (Hussey 1987). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد در محیط کشت حاوی 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با 2 میلی‌گرم در لیتر BA، بیشترین تعداد پیازچه باززا شده تشکیل گردید.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری ارتفاع گیاهچه باززا شده نشان داد که این صفت نیز تحت تأثیر غلظت هورمون سیتوکینین قرار گرفت، به‌طوری‌که کاربرد محیط کشت فاقد هورمون سیتوکینین، منجر به افزایش 30 درصدی در ارتفاع گیاهچه بازاز شده در مقایسه با محیط کشت حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر هورمون سیتوکینین شد. نتایج پژوهش El-Naggar et al. (2012) بر روی تکثیر درون شیشه‌ای گیاه لیلیوم رقم پراتو نیز نشان داد که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین منجر به کاهش ارتفاع گیاهچه باززا شده گردید.

جدول 3. اثر غلظت هورمون سیتوکینین بر صفات مورد ارزیابی در کشت درون شیشه‌ای آماریلیس

Table 3. Effect of cytokinin concentration on evaluated traits in *in vitro* culture of Amaryllis

غلظت هورمون سیتوکینین (mg/l) Cytokinin concentration (mg/l)	تعداد پیازچه باززا شده No. of regenerated bulblet	قطر پیازچه باززا شده (cm) Diameter of regenerated bulblet (cm)	ارتفاع گیاهچه باززا شده (cm) Height of regenerated plantlet (cm)	تعداد ریشه تولید شده No. of produced root	طول ریشه تولید شده (cm) Length of produced root
0	1.00 [b]	0.76 a	4.15 a	6.08 a	2.25 a
0.5	1.00 [b]	0.75 a	3.38 bc	5.56 b	2.21 ab
1	1.19 [a]	0.73 a	3.76 ab	4.69 c	1.88 c
2	1.20 [a]	0.67 b	3.13 c	3.52 d	1.96 bc

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different at probability level of 5% based on LSD test.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری تعداد و طول ریشه تولیدی نشان داد که حضور هورمون سیتوکینین در محیط کشت و همچنین افزایش غلظت آن منجر به کاهش تعداد و طول ریشه تولیدی گردید. تعداد ریشه تولید شده در محیط کشت فاقد هورمون بیش از 1/5 برابر بیشتر از میزان بدست آمده در محیط کشت حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر هورمون سیتوکینین بود. طویل‌ترین ریشه‌ها نیز در محیط کشت فاقد هورمون سیتوکینین حاصل شد ولی تفاوت معنی‌داری با محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر هورمون سیتوکینین نداشت (جدول 3). Siddique et al. (2007) محیط کشت MS حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA را جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی آماریلیس توصیه نمودند. در مطالعه Memar Mosharrafi et al. (2002) که بر روی ریزازدیادی گیاه سوسن چلچراغ انجام شد، مشخص گردید که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین باعث کاهش درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه تولید شده گردید و بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت فاقد هورمون سیتوکینین گزارش گردید که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر صفات مورد ارزیابی: نتایج نشان داد که قطر پیازچه تولید شده تحت تأثیر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری قرار گرفت (جدول 1). فلس‌های جفتی گروه یک که از لایه‌های خارجی‌تر پیاز تهیه شده بودند، پیازچه‌های قطورتری را تولید نمودند ولی با این حال با فلس‌های جفتی گروه دو از این لحاظ تفاوت معنی‌داری نداشتند. از سوی دیگر، فلس‌های جفتی گروه چهار، کمترین میانگین این صفت را به خود اختصاص دادند. از لحاظ ارتفاع گیاهچه باززا شده، همانگونه که در جدول 4 مشاهده می‌گردد بیشترین ارتفاع گیاهچه باززا شده در فلس‌های جفتی گروه دو مشاهده شد. با این حال

تفاوت معنی‌داری از این لحاظ با فلس‌های جفتی گروه یک نداشت. داده‌های به دست آمده از اندازه‌گیری تعداد و طول ریشه‌های تولید شده نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. طبق این نتایج، بیشترین تعداد و طول ریشه‌های تولید شده در فلس‌های جفتی گروه یک حاصل شد. از سوی دیگر کمترین میانگین تعداد ریشه تولید شده، در فلس جفتی گروه چهار و کمترین میانگین طول ریشه تولید شده به ترتیب در فلس‌های جفتی گروه 4 و 3 مشاهده شد (جدول 4).

جدول 4. اثر نوع ریزنمونه بر صفات مورد ارزیابی در کشت درون شیشه‌ای آماریلیس

Table 4. Effect of explant type on evaluated traits in *in vitro* culture of Amaryllis

طول ریشه تولید شده (cm) Root length (cm)	تعداد ریشه تولید شده Root number	ارتفاع گیاهچه باززا شده (cm) Height of plantlet (cm)	قطر پیازچه تولید شده (cm) Bulblet diameter (cm)	موقعیت فلس جفتی Position of twin scale
2.46 a	5.40 a	3.83 ab	0.85 [a]	Twin scale group 1
2.20 a	5.27 ab	3.98 a	0.80 [a]	Twin scale group 2
1.85 b	4.92 b	3.46 bc	0.66 [b]	Twin scale group 3
1.79 b	4.27 c	3.14 c	0.60 [c]	Twin scale group 4

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different at probability level of 5% based on LSD test

طی پژوهشی Rice et al. (2011) اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری (فلس‌های بیرونی، میانی و داخلی) را بر تعداد پیازچه تولید شده در گیاه برانسویجیا آندولاتا (از خانواده آماریلیداسه) مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها بیانگر عدم اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود، با این حال کاربرد فلس‌های جفتی میانی نتایج بهتری را در پی داشت. در مطالعه Rice et al. (2011) عنوان گردید که فلس‌های جفتی میانی پیاز، ضخیم و قطور می‌باشند و نسبت به فلس‌های نازک و باریک از ذخایر غذایی بیشتری برخوردار می‌باشند. تفاوت در سطوح نیتروژن و قند قابل حل در فلس‌های داخلی و خارجی پیاز لیلیوم نیز گزارش شده است (Takayama & Misawa 1980). فلس‌های جفتی حاصل از داخلی‌ترین لایه‌های پیاز، بسیار نازک و باریک هستند و بعلت نازک بودن، سطوح آن‌ها به سرعت خشک می‌گردد و در نتیجه قابلیت تولید پیازچه در این نوع ریزنمونه‌ها کاهش می‌یابد (Rice et al. 2011). با این حال پژوهش Colque et al. (2002) بر روی گیاه *Eucrosia stricklandii* (از خانواده آماریلیداسه) پاسخ متفاوتی را در پی داشت، به‌طوری‌که بیشترین میزان باززایی از ریزنمونه‌های حاصل از داخلی‌ترین لایه‌های پیاز گزارش گردید.

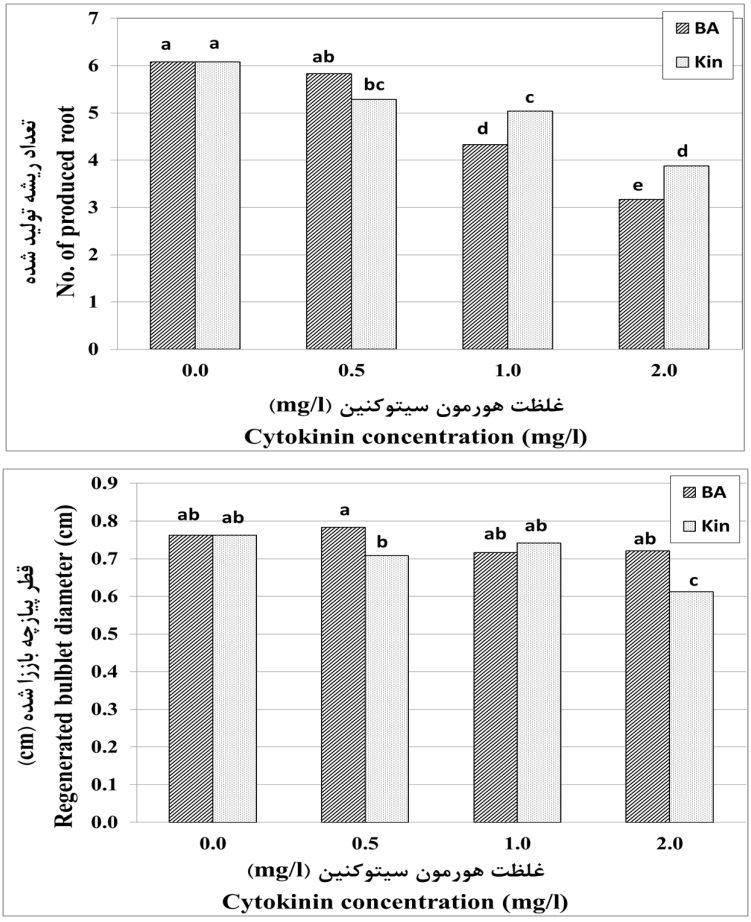
شکل 2. اثر موقعیت فلس جفتی در پیاز مادری بر میزان رشد گیاهچه‌های کشت بافتی. (الف: گیاهچه حاصل از فلس جفتی گروه یک، ب: گیاهچه حاصل از فلس جفتی گروه چهار)

Figure 2. Effect twin scale position in the mother bulb on the growth of tissue culture plantlets. (A: plantlet derived from twin scale group 1, B: plantlet derived from twin scale group 4)

شواهد پژوهش Rice et al. (2011) حاکی از قابلیت باززایی ضعیف فلس‌های جفتی حاصل از خارجی‌ترین لایه‌های پیاز برانسویجیا آندولاتا (از خانواده آماریلیداسه) بود که دلیل آن تأثیر نامطلوب کلریدجیوه بر فلس‌های پیاز عنوان گردید. زیرا در مطالعه آن‌ها جهت ضدعفونی پیازها از ماده گندزدای بسیار قوی (کلریدجیوه) استفاده گردید و تماس مستقیم لایه‌های خارجی پیاز با کلرید جیوه باعث آسیب شدید به این لایه‌ها گردید و در نتیجه قابلیت باززایی آن‌ها نسبت به سایر لایه‌ها کاهش یافت. درحالی که در پژوهش حاضر، از مواد گندزدایی نظیر الکل و هیپوکلریت سدیم استفاده گردید. این مواد در مقایسه با کلرید جیوه آسیب کمتری به بافت‌های پیاز وارد می‌کنند و در نتیجه تأثیر منفی کمتری بر قابلیت باززایی فلس‌ها خواهند داشت. همچنین در این پژوهش، جهت تهیه ریزنمونه‌ها، ابتدا خارجی‌ترین لایه پیاز که در تماس با ماده گندزدا آسیب دیده بود، حذف گردید و سپس ریزنمونه‌های فلس جفتی از بخش های مختلف پیاز تهیه گردید.

اثر متقابل نوع و غلظت هورمون سیتوکینین بر صفات مورد ارزیابی: نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که در بین انواع مختلف اثرات متقابل، تنها اثرات متقابل نوع و غلظت هورمون سیتوکینین بر قطر پیازچه باززا شده ($p\leq0/05$) و تعداد ریشه تولید شده ($p\leq0/01$) معنی‌دار بود (جدول 1). بررسی مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA، بیشترین قطر پیازچه باززا شده را به خود اختصاص دادند. کمترین قطر پیازچه باززا شده نیز در محیط کشت حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin مشاهده شد. در رابطه با تعداد ریشه‌های تولید شده، بیشترین میانگین در محیط کشت فاقد هورمون سیتوکینین و محیط کشت حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA مشاهده شد. افزایش غلظت هر دو نوع هورمون سیتوکینین باعث کاهش تعداد ریشه تولید شده در ریزنمونه‌ها گردید.

کمترین میانگین تعداد ریشه تولید شده در محیط کشت حاوی 2 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (شکل 3).



شکل 3. اثر متقابل نوع و غلظت هورمون سیتوکینین بر قطر پیازچه باززا شده و تعداد ریشه تولید شده آماریلیس

Figure 3. Interaction between type and concentration of cytokinin on diameter of regenerated bulblet and number of produced root in Amaryllis

در پژوهشی Fennell (2002) از ترکیبات هورمونی مختلفی جهت تولید پیازچه از ریزنمونه‌های فلس جفتی گیاه کرینیوم (از خانواده آماریلیداسه) استفاده نمود و در تمامی ترکیبات هورمونی مورد استفاده، پیازچه‌های جدید تشکیل گردیدند. مطالعات نشان می‌دهد میزان هورمون‌های داخلی ریزنمونه‌های فلس جفتی به حد کافی بالا می‌باشد که در نتیجه می‌تواند باعث القاء تولید پیازچه گردد (Maesato et al. 1994). در پژوهش حاضر نیز ریزنمونه‌های فلس جفتی در تمامی ترکیبات هورمونی علائم باززایی را از خود نشان دادند. در پژوهشی Lian et al. (2009) کاربرد محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون کینتین همراه با 0/2

میلی‌گرم در لیتر NAA را جهت القاء تولید پیازچه، از نمونه‌های فلسی تهیه شده از لایه‌های خارجی و میانی پیاز لیلیوم توصیه نمودند. در پژوهش Rahimi et al. (2014) اثر نوع و غلظت هورمون سیتوکینین بر باززایی فلس‌های پیاز لاله واژگون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پیازچه‌های تشکیل شده در محیط کشت حاوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA، نسبت به سایر ترکیبات هورمونی، قطورتر بودند و همچنین تعداد ریشه بیشتری را نیز تولید نمودند که تا حدودی با نتایج پژوهش حاضر مشابه می‌باشد. در تحقیق Lee et al. (2004) کاربرد محیط کشت فاقد هورمون، جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده نرین (ازخانواده آماریلیداسه) در شرایط کشت درون شیشه‌ای توصیه گردید. Amani et al. (2011) نیز از محیط کشت بدون هورمون جهت ریشه‌زایی پیازچه‌های آماریلیس استفاده نمودند. با این حال Zakizadeh et al. (2013) عنوان نمودند مرحله ریشه‌زایی یکی از مراحل حیاتی جهت موفقیت در مراحل پرآوری گیاه آماریلیس می‌باشد و فقدان سیستم ریشه‌ای مناسب، سازگاری گیاهان کشت بافتی را با مشکل مواجه می‌سازد. در پژوهش آن‌ها از هورمون‌های NAA و 2IP جهت ریشه‌زایی نمونه‌های آماریلیس استفاده گردید. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد توسعه سیستم ریشه‌ای در محیط کشت حاوی 4 میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و یا 16 میلی‌گرم در لیتر هورمون 2IP بخوبی صورت گرفت. این درحالی است که شواهد پژوهش حاضر حاکی از بالا بودن پتانسیل ریشه‌زایی در نمونه‌های آماریلیس می‌باشد. در طی مراحل تکثیر و پرآوری نمونه‌های فلسی آماریلیس، فرایند ریشه‌زایی به خوبی صورت می‌گیرد و نیازی به استفاده از هورمون‌های ریشه‌زایی با غلظت بالا و یا مجزا نمودن مرحله ریشه‌زایی از مراحل القاء و تکثیر نمی‌باشد. با این حال چنانچه تنها ریشه‌زایی نمونه‌ها مدنظر باشد، کاربرد هورمون 2IP جهت ریشه‌زایی منطقی به نظر نمی‌رسد، چرا که این هورمون جزو دسته سیتوکنین‌ها طبقه بندی می‌گردد و پیش از آنکه بتواند بر ریشه‌زایی تأثیرگذار باشد، بر افزایش پرآوری و تکثیر مؤثر می‌باشد (Sharifi et al, 2010).

شکل 4. ریشه‌زایی گیاهچه‌های آماریلیس در مرحله تکثیری، در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 4. Rooting of Amaryllis plantlet during *in vitro* culture and at the reproductive stage

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

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد فلس جفتی گروه یک و محیط کشت MS حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر هورمون BA به همراه 0/1 میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بهترین پاسخ رشدی را از لحاظ تکثیر ریزنمونه‌های فلس جفتی آماریلیس در شرایط کشت درون شیشه‌ای ایجاد نمود.

منابع

امانی شهلا، زارعی حسین، علیزاده اجیرلو اسدالله، مشایخی کامبیز (1390) باززایی پیازچه از ریزنمونه‌های تک فلسی با طبق و بدون طبق پیاز آماریلیس (*Hippeastrum hybridum*) در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای. اولین کنگره ملی علوم و فناوری-های نوین کشاورزی، زنجان، دانشگاه زنجان.

شریفی احمد، مشتاقی نسرین، باقری عبدالرضا (1389) کشت بافت گیاهی کاربردی، چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد.

معمار مشرفی معصومه، معینی احمد، توسلیان ایرج (1381) بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد NAA، BAP، ریزنمونه، موقعیت‌های مختلف فلس و دوره نوری بر کشت بافت گل سوسن چلچراغ. مجله علوم زراعی ایران 4، 261-253.

References

Alkema HY (1975) Vegetative propagation of daffodils by double-scaling. Acta Hortic 47, 193-199.

Amani Sh, Zarei H, Alizadeh Ejirloo S, Kambiz Mashayekhi K (2011) Bulblet regeneration from single and twin scale of amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) during *in vitro* culture. First National Congress of Science and Technology in Agriculture, Zanjan, Zanjan University (In Persian).

Aslam F, Habib S, Naz S (2012) Effect of different phytohormones on plant regeneration of Amaryllis hippeastrum. Pakistan J Sci 64, 54-60.

Brown SP, Black RJ (2007) Amaryllis, University of Florida, IFAS Extension.

Chakrabarty D, Gupta VN, Datta SK (2007) Varietal identification and assessment of genetic relationships in Hippeastrum using RAPD markers. Plant Biotechnol 1, 211-217.

Clemson Extension, (1995) Understanding and producing amaryllis. Clemson Extension.

Colque R, Viladomat F, Bastida J, Codina C (2002) Micropropagation of the rare *Eucrosia stricklandii* (Amaryllidaceae) by twin-scaling and shake liquid culture. J Hortic Sci Biotech 77, 739-743.

De Bruyn MH (1997) Micropropagation of amaryllis (*Hippeastrum* × *hybridum*). In: Bajaj YPS Biotechnology in Agriculture and Forestry 40, High-Tech and Micropropagation VI. Springer Verlag, Heidelberg, New York.

Dohare SR (1989) Amaryllis and Hippeastrum. In: Commercial Flowers. Bose TK, Maiti RG, Dhva RS, Eds.). Naya prokash, Calcutta, 573-593.

El-Naggar H, Osman A, Sewedan E (2012) *In vitro* propagation and organogenesis of Lilium 'Prato'. Afr J Biotechnol 11, 14771-14776.

Fennell CW (2002) Micropropagation and secondary metabolite production in *Crinum macowanii*. PhD thesis, University of Natal, Pietermaritzburg.pp. 37-46.

Han BH, Yu HJ, Yae BW, Peak KY (2004) *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. Sci Hortic 103, 39-49.

Hanks GR, Rees AR (1979) Twin-scale propagation of narcissus: a review. Sci Hortic 10, 1-14.

Hussey G (1978) The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Sci Prog 65, 185-208.

Lee SY, Ahn JH, Park YJ (2004) Effects of growth regulators and sucrose concentrations on the bulblet formation through *in vitro* culture of scale segment in *Nerine bowdenii*. J Plant Biotechnol 31, 139-143.

Lian T, Qun-Xian D, Yong-Qing W, et al. (2009) Studies on the technique of tissue culture and rapid propagation of bulbils from Lilium regale. Plant Sci Res 2, 14-19.

Maesato K, Sharada K, Fukui H, et al. (1994) *In vitro* bulblet regeneration from bulbscale explants of *Lilium japonicum* Thunb. Effect of plant growth regulators and culture environment. J Hortic Sci 69, 289-297.

Memar Mosharrafi M, Moeini A, Tavasolian A (2002) Effect of NAA, BAP growth regulators, explants, different positions of scales and light period on tissue culture of *Lilium ledebourii*. J Iranian Crop Sci 4, 253-261 (in Persian).

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

Okubo H (1993) Hippeastrum (Amaryllis). p. 321-334. In: De Hertogh AA, Le Nard M (eds.), The physiology of flower bulbs, Elsevier Publ., Amsterdam.

Rahimi M, Daneshvar MH, Heidari M (2014) Propagation and bulb formation of Fritilaria (*Fritillaria imperialis* L.) via *in vitro* culture. IJPAES 4, 707-710.

Rice LJ, Finnie JF, Van Staden J (2011) *In vitro* bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. S Afr J Bot 77, 305-312.

Santos A, Fidalgo F, Santos I, Salema R (2002) *In vitro* bulb formation of *Narcissus asturiensis*, a threatened species of the Amaryllidaceae. J Hortic Sci Biotech 77, 149-152.

Seabrook JEA, Cumming BG (1977) The *In vitro* Propagation of Amaryllis (*Hippeastrum* spp. Hybrids). *In Vitro* 13, 831-836.

Sharifi A, Moshtaghi N, Bagheri AR (2010) Applied Plant Tissue Culture. First Edition, Jahad-e-daneshgahi publication, Mashhad (in Persian).

Siddique MNA, Sultana N, Haque MA, et al. (2006) Effect of twin scale size and hormones on in vitro propagation of Hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). Plant Tissue Cult Biotechnol 16, 105-110.

Smith RH, Burrow J, Kurten K (1999) Challenges associated with micropropagation of Zephyranthes and Hippestarum sp. (Amaryllidaceae). *In Vitro* Cell Dev- Pl 35, 281-282.

Takayama S, Misawa M, (1980) Differentiation in Lilium bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation i*n vitro*. Physiol Plant 48, 121-125.

Witomska M, Lukaszewska A, Wojtowicz M (2008) Micropropagation of *Hippeastrum* × *chmielii* chm. From scale and scape explants. Propag Ornam Plants 8, 158-160.

Ye L, Shi YM (2008) Research on pollen germination and pollen preservation characteristic of Hippeastrum. J Shanghai Jiaotong Univ (Sci), 26:9-12.

Zakizadeh S, Kaviani B, Onsinejad R (2013) *In vitro* rooting of amaryllis (*Hippeastrum johnsonii*), a bulbous plant, via NAA and 2iP. Ann Biol Res 4, 69-71.