نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۱۹۷-۱۸۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.2, Summer 2018, P. 185-197
ISSN: 2008 - 4730

مطالعه تأثیر کارواکرول، تیمول، بنزیل آدنین و نفتالین استیک اسید بر ریزازدیایی گل لاله واژگون

اسماعیل چمنی[1*]- زهرا افتخاری[2]- علیرضا قنبری[3]- حمیدرضا حیدری[4]- موسی ارشد[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۱

چکیده

تکثیر لاله واژگون از طریق کشت بافت یکی از روش‌های مناسب و سریع جهت جلوگیری از انقراض این گل به دلیل محدودیت در روش‌های مرسوم تکثیر محسوب می‌شود. این پژوهش به منظور مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس های گیاهی و تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی و رشد گل لاله واژگون در قالب دو آزمایش جدا گانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار انجام شد. در آزمایش اول، تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف تیمول (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ پی پی ام)، کارواکرول (۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام) و در آزمایش دوم تیمار های آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر) بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر تیمول و کارواکرول بر قطر پیازچه، تعداد و طول ریشه، تعداد و طول برگ و تعداد و قطر کالوس در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که غلظت ۵۰ پی پی ام تیمول سبب افزایش تعداد پیازچه، ریشه و برگ شد. غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ پی پی ام کارواکرول نیز بیشترین تأثیر را روی شاخص‌های اندازه‌گیری شده داشت. غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد و بالاترین قطر پیازچه را به خود اختصاص داد. همچنین بیشترین تعداد و طول ریشه از غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین تعداد و طول برگ نیز مربوط به تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بود. این نتایج گویای تأثیر مثبت اسانس های گیاهی و تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی و رشد گل لاله واژگون می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، پیازچه، تنظیم کننده رشد گیاهی، کالوس، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

لاله واژگون با نام علمی فریتیلاریا ایمپریالیز[5] متعلق به خانواده لیلیاسه[6]، شامل ۱۰۰ گونه است که ۱۴ گونه مهم از آن بومی ایران است (۶). لاله واژگون از گیاهان زینتی و داروئی بومی و وحشی مناطق کوهستانی ایران بوده (۷، ۲۳) که این ذخایر ژنتیکی ارزشمند در سال‌های اخیر به علت تخریب مراتع، چرای بی‌رویه و طغیان آفات، به شدت در حال انقراض می‌باشد. در لاله واژگون مقدار فلس کم است (۳) در نتیجه کاهش فراوانی تولید سوخک به روش فلس‌برداری وجود دارد. روش ریزازدیادی می‌تواند راه مناسب و سریعی برای تکثیر این گیاه به دلیل محدودیت در روش‌های مرسوم تکثیر این گل محسوب شود (۲).

تا کنون گزارش های محدودی از تکثیر درون شیشه ای لاله واژگون به ویژه در ایران منتشر شده است. محمدی ده چشمه (۱۱) در پژوهشی با بررسی باززایی غیر مستقیم از ریز نمونه های گلبرگ لاله واژگون، محیط کشت B_5 دارای ۰/۱ میلی گرم بر لیتر BAP، ۰/۶ میلی گرم بر لیتر NAA و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر IAA را مناسب ترین تیمار برای تولید سوخچه گزارش نمودند. در بررسی ترکیب های هورمونی مختلف بر باززایی مستقیم لاله واژگون، بالاترین میزان باززایی مستقیم (۸/۳۳ عدد)، بیشترین اندازه سوخچه (۲۶ میلی متر) و بالا ترین تعداد ریشه را در تیمار دو میلی گرم بر لیتر NAA در محیط کشت MS به دست آمد (۱۴). در پژوهش دیگری، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر TDZ بهترین ترکیب هورمونی برای پینه زایی و تیمار یک میلی گرم بر لیتر NAA به همراه یک میلی گرم کینتین بهترین ترکیب هورمونی برای باززایی

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب استاد، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
(*- نویسنده مسئول: (Email : echamani@yahoo.com
۵- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد

DOI: 10.22067/jhorts4.v32i2.31740

5- *Fritillaria imperialis L.*
6- Liliaceae

مستقیم سوخچه معرفی شد (۱). در بررسی ریز ازدیادی سایر گونه های لاله واژگون، شی او و همکاران (۲۲) تولید انبوه فریتیلاریا هوپهنسیس[1] را با سه نوع ریز نمونه فلس، ساقه و برگ در شرایط درون شیشه ای مورد بررسی قرار دادند. بیشترین درصد باززایی در تیمار ۴ میلی گرم بر لیتر NAA و از ریز نمونه های ساقه و برگ به دست آمد. همچنین در بررسی ریز ازدیادی فریتیلاریا کامشاتنسیس[2]، بهترین شرایط برای تشکیل سوخچه در تیمار تاریکی به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد گزارش شد (۱۳).

تیمول و کارواکرول از اجزای اصلی اسانس‌های خانواده نعناعیان به شمار می‌آیند. این دو ترکیب از نظر شیمیایی بسیار به هم شبیه‌اند و فقط جایگاه گروه هیدروکسیل درآن ها متفاوت است (۴). امروزه گزارش های متعددی در زمینه اثرات اسانس ها به عنوان ترکیبات روغنی معطر در صنایع غذایی و کشاورزی در دسترس است. اغلب گزارش های موجود در زمینه خواص ضد میکروبی این ترکیبات در افزایش عمر پس از برداشت محصولات مختلف کشاورزی و باغی می باشند (۲۱). پژوهش ها در زمینه کاربرد اسانس ها در کشت درون شیشه ای گیاهان به ندرت در دسترس می باشد و پژوهش های منتشر شده نیز در زمینه گندزدایی ریز نمونه ها می باشند. تقی زاده و سلگی (۲۰) گزارش کردند که گند زدایی با اسانس های تیمول و کارواکرول به ترتیب بر آلودگی های باکتریایی و قارچی درون شیشه ای ریز نمونه های گره ای چمن برموداگراس موثر می باشند و فعالیت ضد قارچی آن ها بستگی به غلظت و مدت زمان تیمار ها دارد. همچنین غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام اسانس اسطوخودوس در مهار کامل آلودگی ریزنمونه های برگی انگور گزارش شده است (۸). همچنین کاربرد اسانس میخک هندی، دارچین، اسطوخودوس و درخت چای در گندزدایی ریز نمونه های داوودی موفقیت آمیز بوده است (۵). تا کنون گزارشی مبنی بر تاثیر اسانس های گیاهی در زمینه کالوس زایی و باززایی در شرایط درون شیشه ای منتشر نشده است و برای اولین بار در پژوهش حاظر بررسی این ترکیبات بر ریز ازدیادی لاله واژگون مورد بررسی قرار می گیرد. لازم به ذکر است استفاده از ترکیبات طبیعی تعریف نشده همچون پودر موز، عصاره ذرت، شیر نارگیل بر کشت درون شیشه ای گیاهان مختلف تاثیر مثبتی داشته است (۱۰).

با توجه به ارزش زینتی و دارویی لاله واژگون، متاسفانه مطالعات موجود در زمینه ریز ازدیادی این گیاه محدود است. همچنین تا کنون پژوهشی در زمینه تاثیر اسانس های گیاهی علی رغم کاربرد گسترده آن ها در سایر زمینه های باغبانی، در زمینه کشت بافت صورت نپذیرفته است. به همین منظور پژوهش حاضر به منظور دست یابی به روش مناسب ریز ازدیادی لاله واژگون و همچنین تاثیر اسانس های تیمول و کارواکرول انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش پیازها در مرحله خواب از رویشگاه طبیعی آن در مناطق کوهستانی لرستان تهیه و به آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انتقال داده شده و سپس در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در داخل پرلیت مرطوب به مدت ۶-۴ هفته قرار داده شدند. بعد از برطرف شدن نیاز سرمایی پیازها، از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۵ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه جهت ضدعفونی استفاده شد. سپس با آب دو بار تقطیر استریل در سه نوبت به مدت ۱، ۵ و ۱۵ دقیقه شسته شده و در این مرحله از یک سوم پایینی پیازها همراه با صفحه پایگاهی ریز نمونه‌هایی به ابعاد ۱×۱ سانتی متر تهیه شد و به منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی به مدت دو هفته در محیط کشت MS قرار داده شدند. سپس ریز نمونه های به دست آمده برای انجام مراحل بعدی پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

پژوهش حاضر در قالب دو آزمایش جداگانه انجام گرفت. در آزمایش اول، تاثیر غلظت‌های مختلف تیمول (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ پی پی ام) و کارواکرول (۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام) و در آزمایش دوم تاثیر غلظت های مختلف بنزیل آدنین (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر) بر شاخص های قطر کالوس، تعداد پیازچه، قطر پیازچه، تعداد برگ، طول برگ، تعداد ریشه و طول ریشه تولید شده در شرایط درون شیشه ای مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر دو آزمایش، محیط کشت MS پایه (فاقد اسانس و تنظیم کننده رشد) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ریز نمونه های گند زدایی شده در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف ترکیبات ذکر شده در بالا، کشت گردیده و به مدت ۴ ماه در اتاقک رشد تحت دمای ۲°C ± ۲۴، شدت نور ۶۰ -۴۰ میکرومول بر مترمرب بر ثانیه و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در این مدت هر سه هفته یکبار، ریز نمونه ها واکشت می شدند و در مجموع سه واکشت در طول کل آزمایش انجام گرفت. هر دو آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار (هر تکرار شامل ۵ ریز نمونه) طی سال های ۹۰- ۸۹ در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام پذیرفت. داده‌های به دست آمده با استفاده از تبدیل جذری $\sqrt{X+0.5}$ نرمال‌سازی شده و سپس با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SAS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد مقایسه شدند. در نهایت نمودار ها با استفاده از

1- *F. hupehensis*
2- *F. camtschatcensis*

برنامه Excel ترسیم گردیدند.

نتایج و بحث

آزمایش اول

تاثیر اسانس های گیاهی بـر صـفات رشـدی گـل لالـه واژگون

تاثیر اسانس های گیاهی بر تعداد پیازچه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر ترکیبات گیاهی بر قطر پیازچه معنی‌دار نبوده ولی بـر تعـداد پیازچـه در سـطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۱) مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشـان داد کـه در غلظـت های ۵۰ پی پی ام تیمـول (۲/۸ عـدد) و ۱۰ پـی پـی ام کـارواکرول (۲/۶) بیشترین تعداد پیازچه تشکیل شد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نشان داد. کمترین تعداد تشکیل پیازچه در شـاهد، غلظـت ۳۰۰ پـی پـی ام تیمـول و غلظـت هـای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پـی پـی ام کارواکرول مشـاهده شـد (شـکل ۱). همـان طـوری کـه در شـکل ۱ مشخص شده، غلظت‌های پایین ترکیبات گیاهی موثرترین غلظـت در تشکیل پیازچه است و با افزایش غلظت این ترکیبـات، تعـداد پیازچـه کاهش یافت.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر اسانس های گیاهی بر صفات رشدی گل لاله واژگون

Table 1. ANOVA of Herbal Essential Oils Effect on Vegetative Traits of *Fritillaria* Flower

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square			
		تعداد پیازچه Bulb number	قطر پیازچه Bulb diameter	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length
تیمار Treatment	8	0.21*	0.01ns	2.02*	0.08*
خطا Error	36	0.09	0.00	0.55	0.02
ضریب تغییرات CV (%)	-	6.65	15.28	18.90	12.65

**، * و ns به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال یک درصد ، ۵ درصد و عدم معنی داری

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

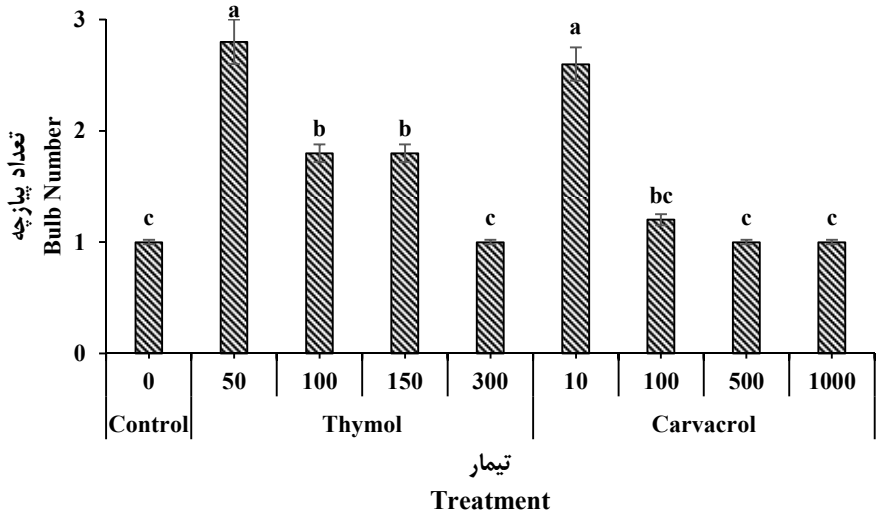
ادامه جدول ۱- تجزیه واریانس اثر اسانس های گیاهی بر صفات رشدی گل لاله واژگون

Table 1- ANOVA of Herbal Essential Oils Effect on Vegetative Traits of *Fritillaria* Flower

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square		
		تعداد برگ leaf number	طول برگ leaf length	قطر کالوس Callus diameter
تیمار Treatment	8	2.93*	0.19*	0.38*
خطا Error	36	0.13	0.02	0.09
ضریب تغییرات CV (%)	-	18.78	12.64	29.32

**، * و ns به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال یک درصد ، ۵ درصد و عدم معنی دار

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

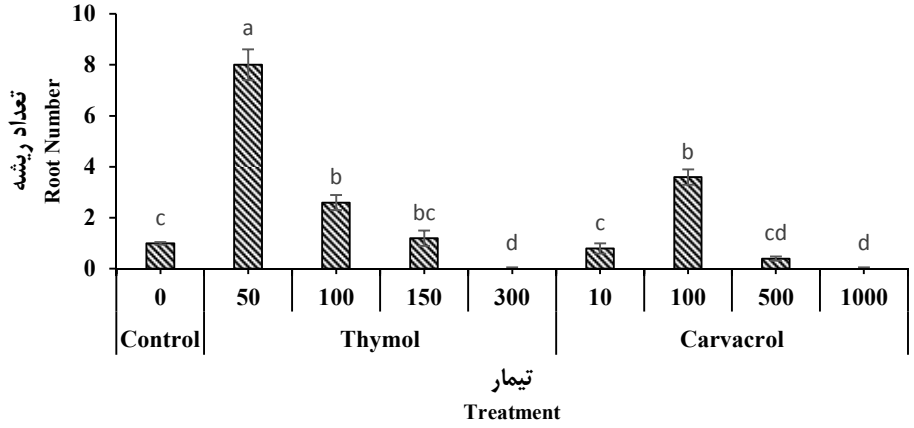


شکل ۱- تاثیر اسانس های گیاهی بر تعداد پیازچه گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 1- Effect of Essential Oils on Bulb Number of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

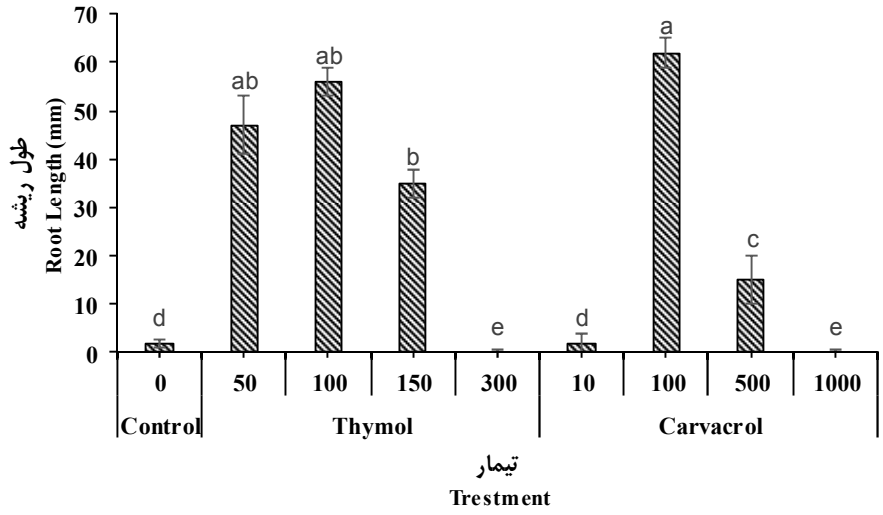
تاثیر اسانس های گیاهی بر تعداد و طول ریشه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیبات گیاهی بر تعداد ریشه و طول ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین تعداد ریشه (۸ عدد) در غلظت ۵۰ پی پی ام تیمول تشکیل شد و با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نشان داد. در غلظت‌های ۳۰۰ پی پی ام تیمول و ۱۰۰۰ پی پی ام کارواکرول نیز ریشه ای تشکیل نشد که از شاهد نیز کم تر بود (شکل ۲). به نظر می رسد که غلظت های بالای اسانس های گیاهی ممکن است از طریق ایجاد سمیت سبب جلوگیری از تشکیل ریشه در پیازچه‌ها در شرایط درون شیشه ای گردیده است. بیشترین طول ریشه نیز در غلظت ۱۰۰ پی پی ام کارواکرول (۶۲ میلی متر) و ۱۰۰ پی پی ام تیمول (۵۶ میلی متر) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای دیگر نشان دادند. کمترین طول ریشه در غلظت‌های ۱۰ پی پی ام کارواکرول و شاهد (۲ میلی متر) مشاهده شد که این دو غلظت اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر داشتند (شکل ۳).



شکل ۲- تاثیر اسانس های گیاهی بر تعداد ریشه گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 2 – Effect of Essential Oils on Root Number of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

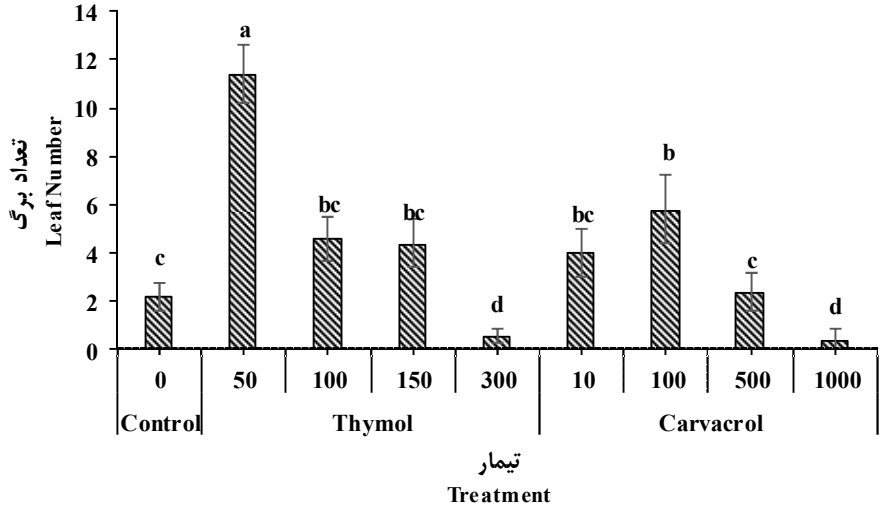


شکل ۳- تاثیر اسانس های گیاهی بر طول ریشه گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 3 – Effect of Essential Oils on Root Length of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

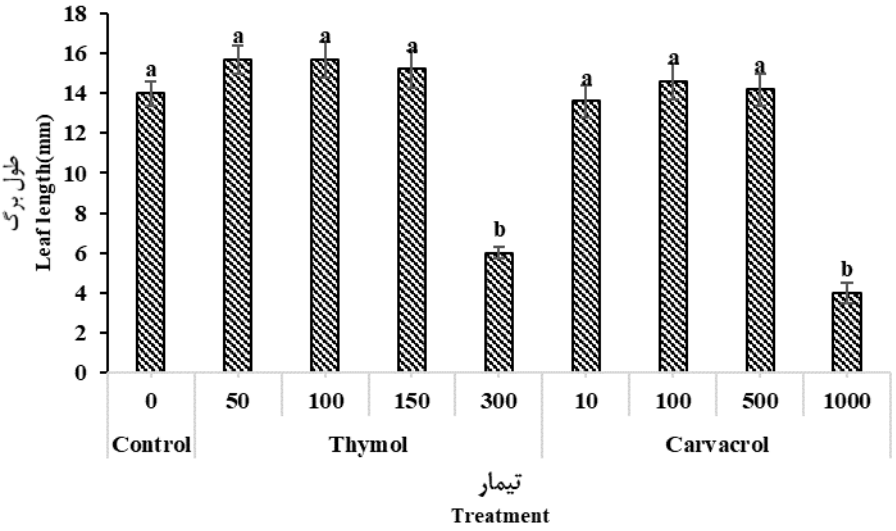
تاثیر اسانس های گیاهی بر تعداد و طول برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر ترکیبات گیاهی هم بر تعداد برگ و هم طول ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها می‌توان دریافت که بیشترین تعداد تشکیل برگ (۱۱/۴) در غلظت ۵۰ پی پی ام تیمول به دست آمده است که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. در بین تیمارها کمترین تعداد برگ را غلظت‌های ۳۰۰ پی‌پی‌ام تیمول و ۱۰۰۰ پی پی ام کارواکرول به خود اختصاص دادند (شکل ۴). همان طور که مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد ترکیبات گیاهی بر طول برگ در تمامی غلظت‌ها به جز ۳۰۰ پی‌پی‌ام تیمول و ۱۰۰۰ پی پی ام کارواکرول تأثیر مثبت داشته و اختلاف معنی داری در بین غلظت‌ها مشاهده نشد (شکل ۵).



شکل ٤- تاثیر اسانس های گیاهی بر تعداد برگ گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 4 – Effect of Essential Oils on Leaf Number of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

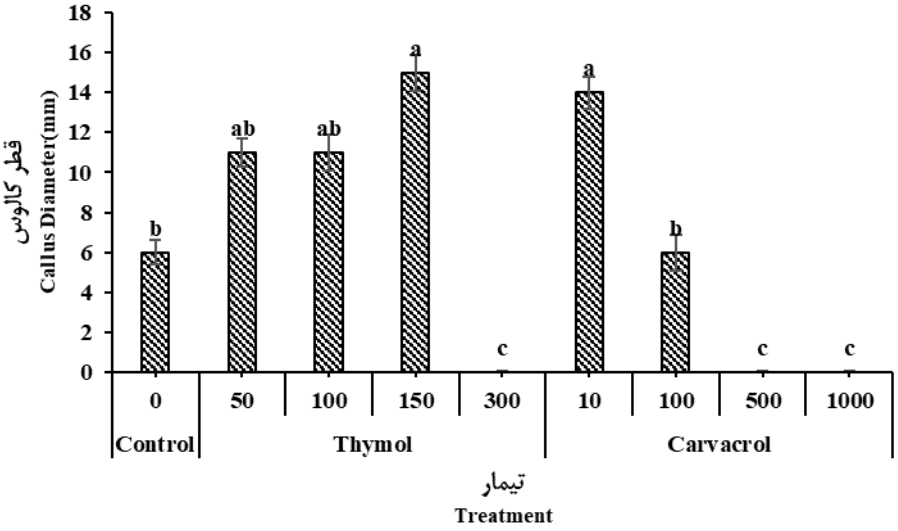


شکل ۵- تاثیر اسانس های گیاهی بر طول برگ گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 5 – Effect of Essential Oils on Leaf Length of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

تاثیر اسانس های گیاهی بر قطر کالوس

تایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر ترکیبات گیاهی بر قطر کالوس تشکیل شده در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). بررسی جدول مقایسه میانگین نشان داد که غلظت های ۵۰ پی پی ام تیمول (۱۵ میلی متر) و ۱۰ پی پی ام کارواکرول (۱۴ میلی متر) سبب ایجاد بیشترین قطر کالوس گردیده اند که به طور معنی‌داری از قطر کالوس تشکیل شده در شاهد (۶ میلی متر) بیشتر بوده است (شکل ۶). همچنین در غلظت های ۳۰۰ پی پی ام تیمول و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام کارواکرول هیچ گونه کالوس تشکیل نشد.



شکل ٦– تاثیر اسانس های گیاهی بر قطر کالوس تشکیل شده در لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 6 – Effect of Essential Oils on Callus Diameter of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

بررسی تأثیر اسانس های گیاهی بر تمامی صفات رشدی حاکی از این است که غلظت‌های پایین این ترکیبات تأثیر مثبتی در رشد داشته ولی با افزایش غلظت در بیشتر صفات، روند نزولی رشد مشاهده گردید به طوری که در غلظت‌های ۳۰۰ پی پی ام تیمول، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام کارواکرول رشد به شدت کاهش یافته و گیاه سوزی ایجاد گردید.

آزمایش دوم

نتایج تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات رشدی گل لاله واژگون

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد و قطر پیازچه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین (BA) و نفتالین‌استیک اسید (NAA) بر تعداد پیازچه و قطر پیازچه تولید شده در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین تعداد پیازچه (۴/۲) با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد و اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر نشان داد.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر هورمون‌ها بر صفات رشدی گل لاله واژگون

Table 2- Variance Analysis Hormones Effect on Vegetative Traits of *Fritillaria* Flower

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square			
		تعداد پیازچه Bulb Number	قطر پیازچه Bulb Diameter	تعداد ریشه Root Number	طول ریشه Root Length
تیمار treatment	6	0.58*	0.02*	3.60*	0.03 ns
خطا Error	28	0.01	0.00	0.16	0.01
ضریب تغییرات CV (%)		10.24	6.10	21.85	12.64

**، * و ns به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال یک درصد ، ۵ درصد و عدم معنی دار

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

ادامه جدول ۲- تجزیه واریانس اثر هورمون‌ها بر صفات رشدی گل لاله واژگون

Table 2. Variance Analysis Hormones Effect on Vegetative Traits of *Fritillaria* Flower

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square		
		تعداد برگ Leaf Number	طول برگ Leaf Length	قطر کالوس Callus Diameter
تیمار Treatment	8	0.76	0.06 ns	0.10*
خطا Error	36	0.16	0.03	0.03
ضریب تغییرات CV (%)		25.10	14.34	18.55

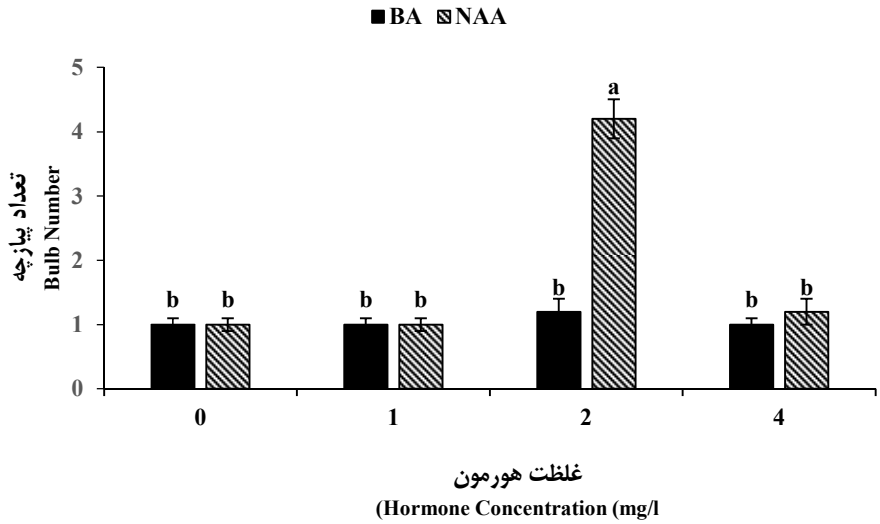
**، * و ns به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال یک درصد ، ۵ درصد و عدم معنی دار

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

همچنین این نتایج نشان داد که غلظت های مختلف BA تاثیری بر تعداد پیازچه تشکیل شده نداشته است (شکل ۷). در زمینه شاخص قطر پیازچه نیز، تیمار های ۲ میلی گرم بر لیتر NAA (۹ میلی متر) و BA (۸/۲ میلی متر) سبب تولید بیشترین قطر پیازچه شده اند که نسبت به سایر تیمار ها و شاهد اختلاف معنی داری نشان داد (شکل ۸). این آزمایش تأثیر مثبت افزایش هورمون اکسین از نوع NAA را بر تعداد و قطر پیازچه لاله واژگون تایید کرد. به نظر می‌رسد افزایش تعداد پیازچه تولید شده در اثر افزایش NAA ناشی از افزایش نسبت اکسین به سایتوکنین در محیط کشت باشد. تیمار هورمونی NAA سطوح هورمونی داخلی را بالا برده و در نتیجه با متوازن شدن نسبت اکسین به سیتوکنین داخلی، اندام‌زایی را موجب می‌شود (۱۱).

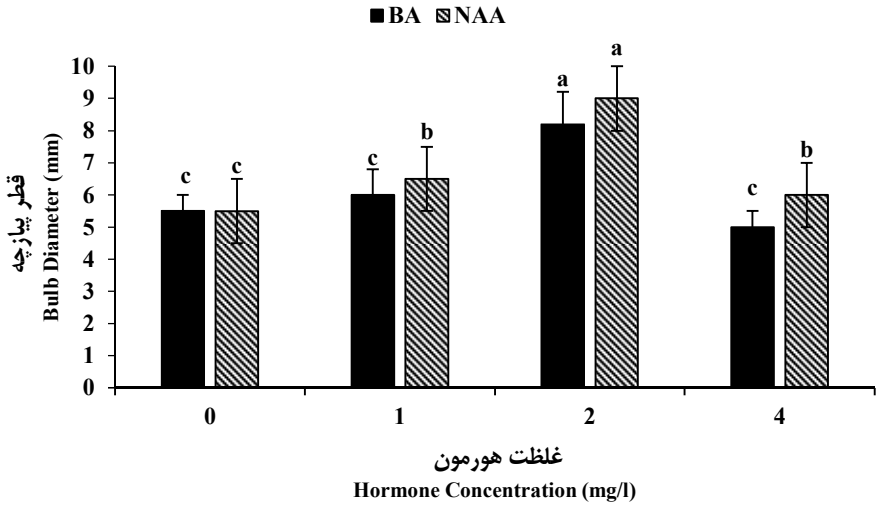
استیمارت و آشر (۱۹) بخش‌هایی از فلس‌های سوسن *Lilium*

longiflorum را روی محیط کشت LS کشت کردند و نشان دادند که افزودن ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA منتج به تولید بیشتر پیازچه از فلس‌های خارجی شد که نتایج این آزمایش با نتایج آزمایش حاضر همسو می‌باشد. همچنین پیریک و استیگمنز (۱۶) بیان کردند که اکسین‌ها برعکس جیبرلین‌ها پیازچه‌زایی در سنبل را افزایش می‌دهد. پادوزینسکا (۱۷) نیز به نتایج مشابهی مبنی بر بهبود یافتن تشکیل پیازچه لاله توسط اکسین‌ها دست یافته بود. در واقع هورمون BA نه تنها تولید پیازچه را تحریک نکرد بلکه مانع از تولید پیازچه نسبت به نمونه شاهد نیز شد. این نتایج با گزارش تاتاری (۲۴)، که عنوان نمود اثر تیمار BA باعث شد تعداد پیازچه، وزن پیازچه و تعداد ریشه کمتری نسبت به شاهد تشکیل شود مطابقت داشت.



شکل ۷- تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر تعداد پیازچه گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 7- Effect of PGRs on Bulb Number of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level



شکل ۸- تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر قطر پیازچه گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 8- Effect of PGRs on Bulb Diameter of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

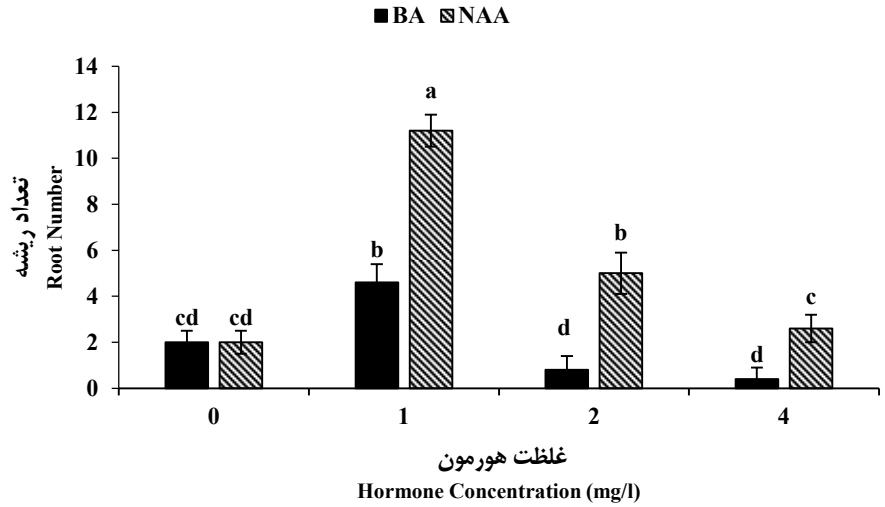
تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد و طول ریشه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BA بر تعداد ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار ولی در طول ریشه معنی‌دار نگردید (جدول ۲).

بررسی جدول مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین تعداد تشکیل ریشه را NAA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به خود اختصاص داد و کمترین تعداد ریشه در تیمار BA با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که هر دو با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نشان دادند (شکل ۹). نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت NAA و BA، تعداد ریشه در گیاهچه های سوسن چلچراغ کاهش می یابد. به نظر می‌رسد افزایش BA باعث شده که نسبت اکسین به سایتوکینین در محیط کشت کاهش یابد و در نتیجه تعداد ریشه‌های تولید شده که ارتباط مستقیمی با نسبت بالای اکسین به سایتوکینین دارد کاهش یابد .پیریک (۱۵) بیان کرد که سایتوکینین‌ها در غلظت پایین تقسیم سلولی را تحریک می‌کنند ولی معمولاً در غلظت‌های بالاتر از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند. نات (۱۲) نیز گزارش کرد که افزایش هورمون NAA بطور معنی‌داری تعداد ریشه را در *L. longiflorum* نسبت به محیط کشت بدون هورمون افزایش می‌دهد. این نتایج با نتایج آزمایش تاکایاما و میساوا (۲۲) نیز همسو می‌باشد. ایشان گزارش کردند که بر همکنش اکسین و سایتوکینین در محیط کشت در تشکیل ریشه و پیازچه از فلس گل سوسن نقش دارد طوری که نسبت اکسین به سایتوکینین بالا تشکیل ریشه را افزایش می‌دهد در حالی که در نسبت اکسین به سایتوکینین پایین تشکیل ریشه کاهش یافته و تشکیل پیازچه حالت غالب دارد. تاکایاما و میسولا (۲۳) آزمایشی را به منظور بررسی اثرات فیزیولوژیکی کینیتین و بنزیل آدنین بر روی *L. auratum* و *L. speciosum* انجام دادند نتایج نشان داد که در غلظت پایین‌تر کینیتین رشد ریشه تحریک شد و یا بطور جزئی تحت تاثیر قرار گرفت در حالی که همان غلظت BA بطور کامل تشکیل ریشه را مهار کرد این نتایج نیز با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد.

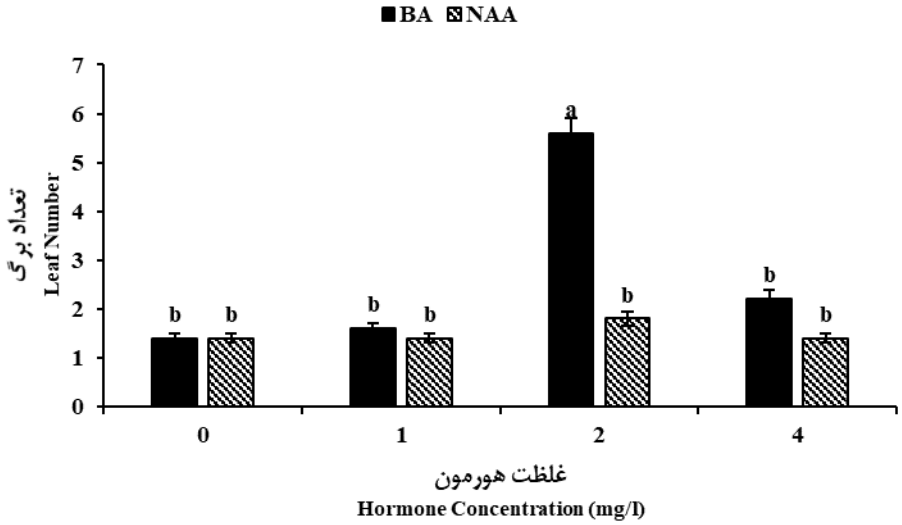
تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد و طول برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر تعداد برگ در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است ولی در خصوص طول برگ تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). همانطور که مقایسه میانگین داده‌ها نشان می دهد (شکل ۱۰) تیمار BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد برگ را به خود اختصاص داده است که تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمارهای دیگر نشان داد. به نظر می‌رسد تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین با تأثیر بر رشد طولی سلول‌ها توانسته است شاخساره‌های طویل‌تری تولید کند. نتایج مشابهی در یافته‌های تفرا و واناکرایروج (۲۵) مشاهده گردید که سایتوکینین‌ها بویژه BA تشکیل و تکثیر شاخه‌ها را افزایش داده است.



شکل ۹- تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر تعداد ریشه گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

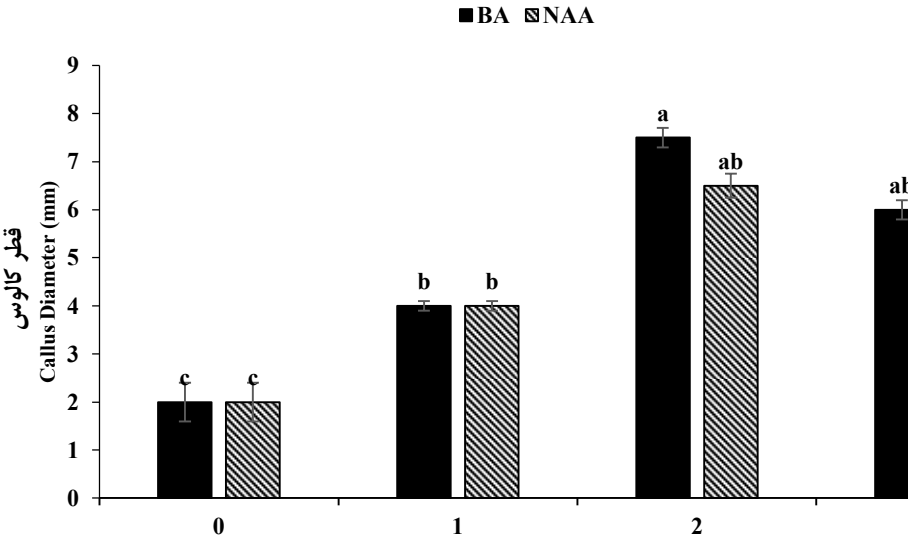
Figure 9- Effect of PGRs on Root Number of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level



شکل ۱۰- تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر تعداد برگ گیاه لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 10- Effect of PGRs on Leaf Number of *Fritillaria.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level

خرازی و همکاران (۹) نیز دریافتند که افزایش غلظت سایتوکینین تکثیر شاخه و تعداد برگ را افـزایش مـی‌دهـد. همچنـین نتـایج ایـن پژوهش نشان داد که غلظت های مختلـف NAA تـاثیری بـر تعـداد برگ تولید شده در گیاهچه های سوسن چلچراغ نداشته است.



شکل ۱۱- تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر قطر کالوس لاله واژگون. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون ، با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند

Figure 11- Effect of PGRs on Callus Diameter of *Fritillar.* The data in each column followed by same letter are not significantly different by Duncans multiple range test at 5 % of probability level.*ia*

تأثیر تنظیم کننده‌های رشد بر قطر کالوس

نتـایج حاصـل از تجزیـه واریـانس داده‌هـا نشـان داد کـه تـأثیر تنظیم‌کننده‌های رشـد بـر قطـر کـالوس در سـطح احتمـال ۵ درصـد معنی‌دار گردید (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسـه میـانگین داده هـا

(شکل ۱۱)، غلظت های ۴ میلی گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی گرم بر لیتر BA سبب تشکیل بیشترین قطر کالوس گردید که هر چند نسبت به تیمار های ۲ میلی گرم بر لیتر NAA و ۴ میلی گرم بر لیتر BA اختلاف معنی داری نداشت، اما نسبت به سایر تیمارها به طور معنی داری بیشتر بود.

منابع

1. Alizadeh Ajirlo S., and Kargar M. 2016. Effect of Clone and Growth Regulators on Callus and Bulblet Formation Using Daughter Bulb Explants of Fritillary (*Fritillaria imperialis* L.). Plant Production, 39(2): 81-94.
2. Arora R., and Bhojwani S. 1986. In vitro propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke-anxiety endangered medicinal plant. Plant Cell Reports. 8: 44- 47.
3. Bryan J. 1989. Bulbs. Portlands: Timber press. Oregon, 451pp.
4. Buchanan R.L., and Shepherd A.J. 1981. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. Journal of Food Science. 46: 976- 977.
5. Deen W., Thepsithar C., and Thongpukdee A. 2013. In vitro culture medium sterilization by chemicals and essential oils without autoclaving and growth of chrysanthemum nodes. World academy of Science, Engineering and Technology, 7: 6-24.
6. De Hertogh A., Lenard M. 1993. The physiology of flower bulbs. Elsevier. P. 718- 739.
7. Ebrahimie E., Mohammadie-Dehcheshmeh M., Habashi A.A. Ghannadha, M.R., Ghareyazie B., Yazdi-samadi B. 2006. "Direct shoot regeneration from cumin, *Cuminum cyminum* L". Embryo, 54-58.
8. Gouran, A., Mozafari A., and Ghaderi N. 2012. The effect of antimicrobial agents on the surface sterilized grape explants in in vitro culture. 6th congress of the Agricultural Research findings. Kordestan University.
9. Kharrazi M., Nemati H., Tehranifar A., Bagheri A., Sharifi A. 2011. In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of Vitrification. Journal of Environmental Biology Sciences. 5 (13): 1-6.
10. Metzger J. 1986. "Hormones and reproductive development". In: Plant growth and development, ed. Davis, P. J. Martinus Nigh off, Boston.
11. Mohammadi Dehcheshmeh M. 2005. The use of tissue culture technique in Fritillaria endangering species reproduction of native of Iran. MSc Thesis, Tehran University.
12. Nhut D. T. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Reports. 17: 913-916.
13. Ohkawa M., Kitajima J., Nishino K., and Ohkawa N. 1999. Studies on the Propagation of Fritillaria camtschatcensis Ker-Gawl. by In Vitro Culture II: Effect of Plant Hormones on the Growth, Leaf Emergence, and Rooting of Bulblets. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 68: 184-188.
14. Paek K.Y., Murthy, H.N. 2002. High frequency of Bulblet regeneration from bulb scale section of *Fritillaria thunbergii.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68: 247-252.
15. Pierik R. L. M. 1998. In vitro culture of higher plants. Ferdowsi university press. 406p.
16. Pierik R. L. M. and Steegmans, H. H. M. 1975. Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and etephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb scale segments of hyacinth. Journal of Plant Physiology. 34: 14-17.
17. Podwyszynska M. 2006. Improvement of bulb formation in micropropagted tulips by treatment with NAA and Paclobutrazol or accymidol. Acta Horticulturae. 725: 679-684.
18. Rix E.M. 1977. Fritillaria L. (Liliaceae) in Iran. Journal of Botany. 1, pp. 75–95.
19. Stimart D. J. and Ascher D. D. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum*. Journal of the American Society for Horticultural Science. 103: 182-184.
20. Solg M. 2014. Evaluation of plant-mediated Silver nanoparticles synthesis and its application in postharvest Physiology of cut Flowers. Physiology and Molecular Biology of Plants, 20(3): 279–285.
21. Solgi M., and Taghizadeh M. 2014. The Application of Essential Oils and Silver Nanoparticles for Sterilization of Bermuda grass Explants in in vitro Culture. International Journal of Horticultural Science and Technology, 1(2): 131-140.
22. Takayama S., and Misawa M. 1979. Differentiation in *Lilium*, bulb scales grown in vitro. Effectof various cultural conditions. Physiologia Plantarum, 46(2): 184-190.
23. Takayama, S. and Misaula, M. 1982. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in Lilium bulbscales growth in vitro. Plant and cell physiol. 23(1): 67-74.
24. Tatari M., Fotouhi Ghazvini R., Hamidoghli Y. 2004. Influence of growth regulators and explants of Chandelie lily scales in vitro culture (*Lilium ledebourii*). Journal of Agricultural Sciences, 1(2): 19-28.
25. Tefera W., Wannakrairoj S. 2006. Synergistic effects of some plant growth regulators on in vitro shoot proliferation of korarima (*Aframomum corrorima*). African Journal of Biotechnology, 5: 1894-1901.

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.2, Summer 2018, P. 185-197
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۱۹۷-۱۸۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Effect of Carvacrol, Thymol, BA and NAA on in vitro Regeneration in *Fritillaria imperialis* L.

E. Chamani[1*]- Z. Eftekhari[2]- A.R. Ghanbari[3]- H. R. Heydari[4]- M. Arshad[5]

Received: 26-11-2014
Accepted: 22-05-2018

Introduction: *Fritillaria imperialis* L. is an ornamental and medicinal plant native to mountainous regions of Iran. This plant genetic resource is in danger of extinction, Because of grazing livestock and pest outbreaks. Therefore, micro propagation of Fritillaria through in vitro regeneration is essential for conservation and commercial production. Thymol and Carvacrol are one of the main essential oil compounds in family Lamiaceae.

Material and Methods: *Fritillaria imperialis* L. bulbs in dormancy stage obtained from mountainous regions of Lorestan in Iran and were placed in cold room at +4 °C for 4-6 weeks. Then, Bulbs were surface-sterilized with 70% ethanol for 45 s followed by immersion in 5% (v/v) NaOCl solution for 20 min with gentle agitation, and then rinsed three times in sterile double distilled water. Present study was conducted in two separate experiments. In first experiment, effect of different concentration of Thymol and Carvacrol and in second experiment, different concentration of NAA and BA on in vitro characteristics of *Fritillaria* was evaluated. Explants (1× 1 cm) prepared from the lower third of scales with basal plate and were placed in MS basal medium supplemented with different concentrations of Thymol (50, 100, 150 and 300 ppm), Carvacrol (10, 100, 500 and 100 ppm), BA (1, 2 and 4 mg/l) and NAA (1, 2 and 4 mg/l).All cultures were incubated in a growth chamber at 24±2°C, and a photosynthetic photon flux of 40-60 µmol m–2 s–1 was provided by cool white fluorescent lamps with a 16-h photoperiod. This experiment wascarried out in completely randomized designs with fivereplications.

Results and Discussion: Analysis of variance showed that Thymol and Carvacrol were not effective on number of new bulblets but had significant effects on bulb diameter, number and length or roots, number and length leaves and callus induction and diameter of callus obtained from scales ($P< 0.05$). The highest rate (3 bulblets) of bulblets formation was obtained fromMS medium supplemented with 50 ppm Thymol that showed significantly difference from other treatments. Medium containing 10 ppm Carvacrol gave the highest Bulblet formation (2.5 bulblets) between Carvacrol treatments. Investigation of rooting was done by assessment of the number and length of roots. Mean comparison of the effect of cultivar type on root number showed that the largest number of roots per explant was obtained fromMS medium containing 50 ppm Thymol. Lowest number of roots observed in mediums supplemented with 300 ppm Thymol and 100 ppm Carvacrol. The best medium for increasing the root length per explant (10.90 cm) was MS medium supplemented with 100 ppm Carvacrol, while the least increasing in root length per explant observed fromculture mediums contained 300 ppm Thymol and 100 ppm Carvacrol. Also, the largest number of leave formation obtained fromculture medium supplemented with 50 ppm Thymol that significantly higher than other treatments. Statistical analysis (ANOVA) of the data showed that high frequency callus induction and formation occurred in MS mediums contained 50, 100 and 150 ppm Thymol and 10 ppm Carvacrol and culture mediums supplemented with 300 ppm Thymol and 1000 ppm Carvacrol showed least callus induction. In contrast, largest callus diameter observed in culture mediums supplemented with 300 ppm Thymol and 500, 100 ppm Carvacrol.

Statistical analysis of results showed that different concentrations of BA and NAA had significant effects on bulblets number and bulblets diameter ($P<0.05$). High frequency of bulblets formation obtained fromMS mediums containing 2 mg/l and least bulblets formed in culture medium supplemented with 4 mg/l BA. Stimart and Ascher (1978) observed highest number of bulblets formation in culture of *Liliumlongiflorum*L. Scales on LS medium supplemented with 0.3 mg/l NAA that correlated with our study. Also, Pierik and Steegmans (1975) explained that auxins versus Gibberellins increased number of bulb formation in *Hyacinthus orientalis*. Analysis of variance showed that effects of BA and NAA only was significant in root and leaf number and no significant

1, 2, 3 and 4- Professor, MSc Graduate, Associate Professor and Ph.D. Student, Department of Horticultural Science and Landscape, Faculty of Agricultural Science and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
(*-Corresponding Author Email: echamani@yahoo.com)
5- Assistant Professor Deparment of Horticultural Sciences, Mahabad branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran

in root and leaf length. The highest and lowest number of roots observed in MS mediums supplemented with 2 mg/l NAA and 4 mg/l BA, respectively. Pierik (1998) demonstrated that Cytokinins in low concentrations induced cell division but in high concentrations inhibited root formation. Nuth (1998) concluded that in *LiliumLongiflorum* medium containing NAA significantly increased root formation than PGRs free medium. Statistical analysis of results showed that different concentrations of BA and NAA had significant effects on callus induction and formation in *Fritillariaimperialis* L. ($P<0.05$). High rate of callus formation was obtained fromMS mediums supplemented with 2 and 4 mg/l NAA and 2 mg/l BA.

Conclusion: Thymol and Carvacrol as additives to tissue culture medium can improve some parameters of *Fritillariaimperialis* L. in vitro propagation like bulblet diameter, roots and leaves number and size. In this context, Thymol showed better responses than Carvacrol and 50 ppm concentration of Thymol was more effective. Such plant compounds needs to be more considered in tissue culture mediums. Also we concluded that Auxins in comparison to Cytokinins was more effective in propagation of *Fritillariaimperialis* L. through *in vitro*bulblet formation.

Keywords: Bulblet, Callus, Essential oil, In Vitro culture, Plant growth regulator