Effects of growth regulators on callus induction, plant regeneration and bulb formation of *Allium akaka* ssp. *akaka*

Arezoo Pazoki, Mahboobeh Zare Mehrjerdi*, Maryam Norouzi, Shirin Dianati Daylami
Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
mzarem@ut.ac.ir

Abstract
Allium akaka ssp. *akaka* is a medicinal plant belongs to the Amaryllidaceae family. It is native to Iran and listed as endangered due to over collection. Seeds of *Allium akaka* subsp. *akaka* have dormancy and until now, there have been no reports on *in vitro* propagation of this plant. In this study, effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Allium akaka* ssp. *akaka* were investigated. Also, the effect of sucrose percentage and ABA growth regulator on bulb formation in regenerated shoots was studied. The results indicated that the highest callus induction (93.7%) was achieved in the medium with 0.1 mg/l 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) in combination with 0.5 mg/l Thidiazuron (TDZ). Shoot regenerated at the highest frequency (91.6%) in the medium with 1 mg/l 1-Naphthaleneacetic acid or 1 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) and 1 mg/l Thidiazuron, while, the highest number of shoots (9.7 shoots) belonged to the 0.5 mg/l 1-Naphthaleneacetic acid with 0.5 mg/l Thidiazuron. The culture medium containing 6% of sucrose supplemented with 1 mg/l ABA indicated the highest rate of bulb formation (100%).
Keywords: Indole-3-butyric acid (IBA), *In vitro* proliferation, 1-Naphthalene acetic acid (NAA), Thidiazuron, Tissue culture

* Corresponding Author: mzarem@ut.ac.ir

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شمارهٔ سی و هشتم، زمستان ۱۳۹۷، صفحهٔ ۸۰-۶۹
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۲۴
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۰۹/۲۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۱۲/۱۲

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی، باززایی و تولید سوخ در گیاه والک (*Allium akaka* ssp. *akaka*)

آرزو پازوکی، محبوبه زارع مهرجردی *، مریم نوروزی، شیرین دیانتی دیلمی
گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

والک (*Allium akaka* ssp. *akaka*) گیاهی دارویی از خانوادهٔ Amaryllidaceae است. این گیاه، بومی ایران است و به‌دلیل برداشت بی‌رویه با خطر انقراض مواجه شده است. والک ویژگی خواب بذر دارد و تاکنون پژوهشی بر تکثیر درون‌شیشه‌ای آن انجام نشده است. در پژوهش حاضر، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و باززایی در گیاه والک بررسی شد. همچنین تأثیر درصد ساکارز و حضور تنظیم‌کنندهٔ رشد آبسزیک اسید (ABA) بر تولید سوخ در برگساره‌های باززاشده ارزیابی شد. نتایج، بیشترین کالوس‌دهی (۹۳/۷ درصد) را در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید (NAA) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (TDZ) نشان دادند. بیشترین درصد باززایی (۹۱/۶ درصد) نیز در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید یا ایندول -۳- بوتیریک اسید (IBA) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون به دست آمد؛ درحالی‌که بیشترین میزان تولید برگساره (۹/۷ برگ) به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون متعلق بود. بیشترین درصد تولید سوخ از برگساره‌ها (۱۰۰ درصد) در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید با ۶ درصد ساکارز به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: تکثیر درون‌شیشه‌ای، کشت بافت، ایندول -۳- بوتیریک اسید (IBA)، ۱- نفتالن استیک اسید (NAA)، تیدیازورون (TDZ)

مقدمه

جنس آلیوم (*Allium*) از خانوادهٔ Amaryllidaceae، یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های گیاهان تک‌لپه‌ای با حدود ۹۰۰ گونه در جهان است (Akhavan *et al.*, 2014). ۱۲۶ گونه و زیرگونه از این جنس در ایران گزارش شده‌اند (Memariani *et al.*, 2012). گیاه دارویی والک (*Allium akaka*) گونه‌ای از گیاهان زیرجنس *Melanocrommyum* است و از لحاظ گیاه‌شناسی و خواص دارویی شباهت بسیاری با دیگر گیاهان جنس آلیوم دارد (Fritsch and Abbasi, 2013).

محل رویش *Allium akaka* در منطقهٔ شمال غربی ایران، غرب دریای خزر، خارج از ناحیهٔ هیرکانی و کوه‌های تالش است (Fritsch and Abbasi, 2013). از برگ و پیاز والک استفادهٔ خوراکی می‌شود. این گیاه علاوه‌بر ارزش غذایی، خواص دارویی مانند کاهندگی چربی خون، تنظیم‌کنندگی قند خون و آثار ضدباکتری، ضد ویروس و ضدتومور دارد (Vazquez-Prieto and Miatello, 2010). مهم‌ترین مواد مؤثرهٔ موجود در این گیاه، آلین، آلیسین و آجوان هستند که در درمان سلول‌های سرطانی، فشار خون و تقویت سیستم ایمنی بدن نقش مهمی دارند و با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر حفاظت از کبد و کاهش خطر بیماری‌های قلبی و عروقی مؤثر هستند (Kamenetsky and Rabinowitch, 2006).

والک، گیاهی چند ساله است که در ماه‌های اردیبهشت و خرداد ظاهر و از طبیعت برداشت می‌شود. برداشت‌های بی‌رویه و ناصحیح این گیاه باعث شده است این گیاه ارزشمند در فهرست گیاهان در معرض انقراض قرار گیرد. با توجه به ارزشمندی ذخایر ژنتیکی هر کشور، توجه به حفظ ژرم‌پلاسم این گیاه ضروری است. با توجه به اینکه بذر این گیاه خواب دارد، بهینه‌کردن کشت بافت و تکثیر این گیاه به حفظ ژرم پلاسم و تولید انبوه آن کمک و نیز مسیر را برای تولید متابولیت‌های ثانویهٔ این گیاه در شرایط درون شیشه هموار می‌کند.

بررسی‌های مختلفی بر تکثیر گیاهان جنس آلیوم با کشت بافت انجام شده‌اند و از این روش برای تکثیر کلونال و حفظ درون‌شیشه‌ای بسیاری از گونه‌های جنس آلیوم استفاده شده است (Myers and Simon, 1999; Toaima *et al.*, 2003; Luciani *et al.*, 2006; Banarus, 2014; Hassan *et al.*, 2014)؛ اما تاکنون تکثیر کشت بافتی گیاه والک بررسی نشده است. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد از عوامل بسیار مؤثر در کشت بافت است. بررسی‌ها نشان داده‌اند نسبت حدواسط اکسین به سیتوکینین، کالوس‌زایی را القا می‌کند و نسبت زیاد اکسین به سیتوکینین و سیتوکینین به اکسین به‌ترتیب به باززایی ریشه و ساقه منجر می‌شوند (Ikeuchi *et al.*, 2013). کربوهیدرات از دیگر عواملی است که برای حفظ پتانسیل اسمزی و به‌عنوان منبع انرژی و کربن در کشت بافت استفاده می‌شود و ساکارز متداول‌ترین شکل استفاده از آن است (Yaseen *et al.*, 2013). در پژوهشی بر ریزنمونهٔ مریستم ریشهٔ سیر (*Allium sativum*)، تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر ۶-بنزیل آدنین (6-Benzyladenine)، ۰/۰۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) با ۲ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید (NAA) در محیط‌کشت B5 (Gamborg *et al.*, 1976)، ۹۳/۴

درصد کالوس‌دهی و تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با ۶ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید، ۶۲/۵ درصد باززایی را موجب شدند (Barandiaran *et al.*, 1999). استفاده از 2,4-D با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌کشت B5 نیز به ۹۳ درصد کالوس‌زایی در سیر منجر شده است (Fereol *et al.*, 2002). در بررسی دیگر بر سیر، در محیط‌کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) دارای 2,4-D با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و کینتین (Kinetin) با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر ۸۵ درصد کالوس‌دهی و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۵۴ درصد باززایی به دست آمد (Khan *et al.*, 2004). در گیاه *A. chinenes* استفاده از 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل آدنین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط‌کشت B5، ۶۵/۲ درصد کالوس‌زایی و تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۱ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید، ۵۸/۸ درصد باززایی را موجب شدند (Yan *et al.*, 2009). در موسیر (*A. hirtifolium*) نیز بیشترین درصد کالوس‌زایی در ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و بیشترین باززایی در ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) مشاهده شدند (Farhadi *et al.*, 2017).

به‌دلیل اهمیت تنظیم‌کننده‌های رشد در بهینه‌کردن شرایط کشت بافت یک گیاه، در پژوهش حاضر، اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌دهی، باززایی و تولید برگساره و همچنین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد با درصد ساکارز بر تولید سوخ در برگساره‌های باززا شدهٔ والک بررسی شدند. پژوهش حاضر، نخستین بررسی در زمینهٔ کشت بافت این گیاه دارویی ارزشمند و مواجه با خطر انقراض است.

مواد و روش‌ها

برای کالوس‌دهی، باززایی و تولید سوخ در والک (*A. akaka*)، سوخ‌های این گیاه از منطقهٔ زنجان (۴۸ درجه و ۵۱ دقیقهٔ طول شرقی و ۳۶ درجه و ۴۶ دقیقهٔ عرض شمالی) جمع‌آوری و استفاده شدند. برای انجام آزمایش، ابتدا پوشش سوخ‌ها و ریشه‌های آنها حذف شدند و سوخ‌های آماده‌شده به‌مدت ۶۰ دقیقه با آب شستشو داده شدند؛ سپس پنج دقیقه در الکل ۷۰ درصد و ۱۵ دقیقه در سدیم هیپوکلریت ۱۰ درصد با توین ۲۰ (یک قطره برای هر ۵۰ میلی‌لیتر) ضدعفونی شدند. سوخ‌ها پس از هر مرحله ۳ بار با آب‌مقطر استریل شستشو شدند.

برای تعیین بهترین ترکیب از تنظیم‌کننده‌های رشد برای کالوس‌دهی با بررسی منابع، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار طراحی شد. تیمارها شامل ترکیبی از غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با غلظت‌های ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین یا تیدیازورون بودند. در این آزمایش از ریزنمونهٔ صفحهٔ پایگاهی (Stem-disc) و محیط‌کشت B5 (Gamborg *et al.*, 1976) استفاده شد. نمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از ۸ هفته، درصد کالوس‌زایی در هر تکرار براساس تعداد ریزنمونه‌های کالوس‌داده به تعداد کل ریزنمونه‌ها

ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد. نمونه‌ها هر چهار هفته یک‌بار واکشت شدند.

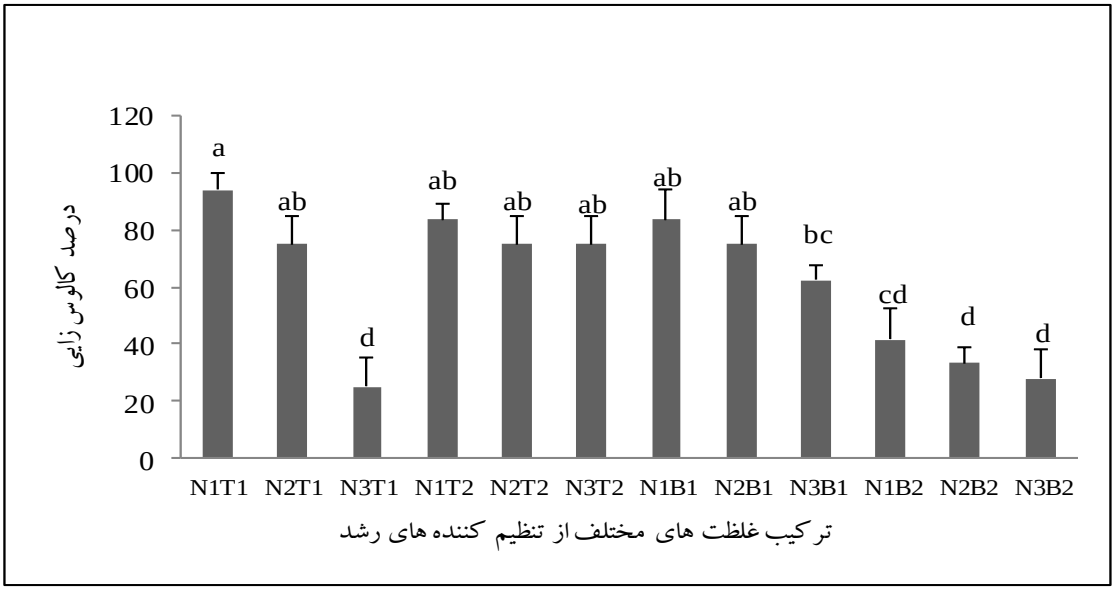
برای تعیین بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بر کالوس‌های به‌دست‌آمده انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ترکیبی از غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید یا ایندول -۳- بوتیریک اسید (IBA) با غلظت‌های ۰/۵و ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون بودند. از کالوس‌های هم‌اندازهٔ به‌دست‌آمده از آزمایش قبل و محیط‌کشت B5 برای انجام این آزمایش استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از هشت هفته، درصد باززایی براساس تعداد کالوس‌های باززاشده به تعداد کل کالوس‌ها محاسبه و تعداد برگساره‌های تشکیل‌شده در هر کشت نیز ثبت شد. نمونه‌ها هر چهار هفته یک‌بار واکشت شدند.

برای تولید سوخ از برگساره‌های باززایی‌شده، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طراحی شد. تیمارهای آزمایش شامل محیط‌های کشت B5 حاوی ساکارز در دو غلظت ۶ و ۱۲ درصد، بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد یا حاوی آبسزیک اسید (ABA) با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بودند. نمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از شش هفته، درصد تولید سوخ در هر تکرار براساس تعداد ریزنمونه‌های سوخ‌داده به تعداد کل ریزنمونه‌ها ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد. نمونه‌ها هر ۴ هفته یک‌بار واکشت شدند.

تحلیل آماری: تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS، نسخه‌های ۳، ۱ و ۹ انجام و برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌دهی والک: نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی والک نشان دادند بین تیمارهای مختلف در کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد (شکل ۱). مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین درصد کالوس‌زایی به تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (۹۳/۷ درصد) تعلق داشت و درصد کالوس‌زایی در این تیمار با تیمارهایی که در آنها از غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین یا تیدیازورون یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون استفاده شده بود تفاوت معنی‌داری نداشت. کمترین درصد کالوس‌زایی به تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (۲۵ درصد) تعلق داشت که با تیمارهایی که در آنها از غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین استفاده شده بود تفاوت معنی‌داری نداشت. در همهٔ تیمارهای اعمال شده کالوس تشکیل شد و شروع کالوس‌دهی از انتهای هفتهٔ دوم بود.



شکل ۱- مقایسهٔ درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های صفحهٔ پایگاهی سوخ والک در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد نفتالن ۳-استیک اسید (N) با ۶-بنزیل آدنین (B) و تیدیازورون (T)- N1 تا N3 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن ۳- استیک اسید، B1 و B2 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و T1 و T2 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون هستند. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ معنی‌داربودن میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۱ براساس آزمون دانکن هستند.

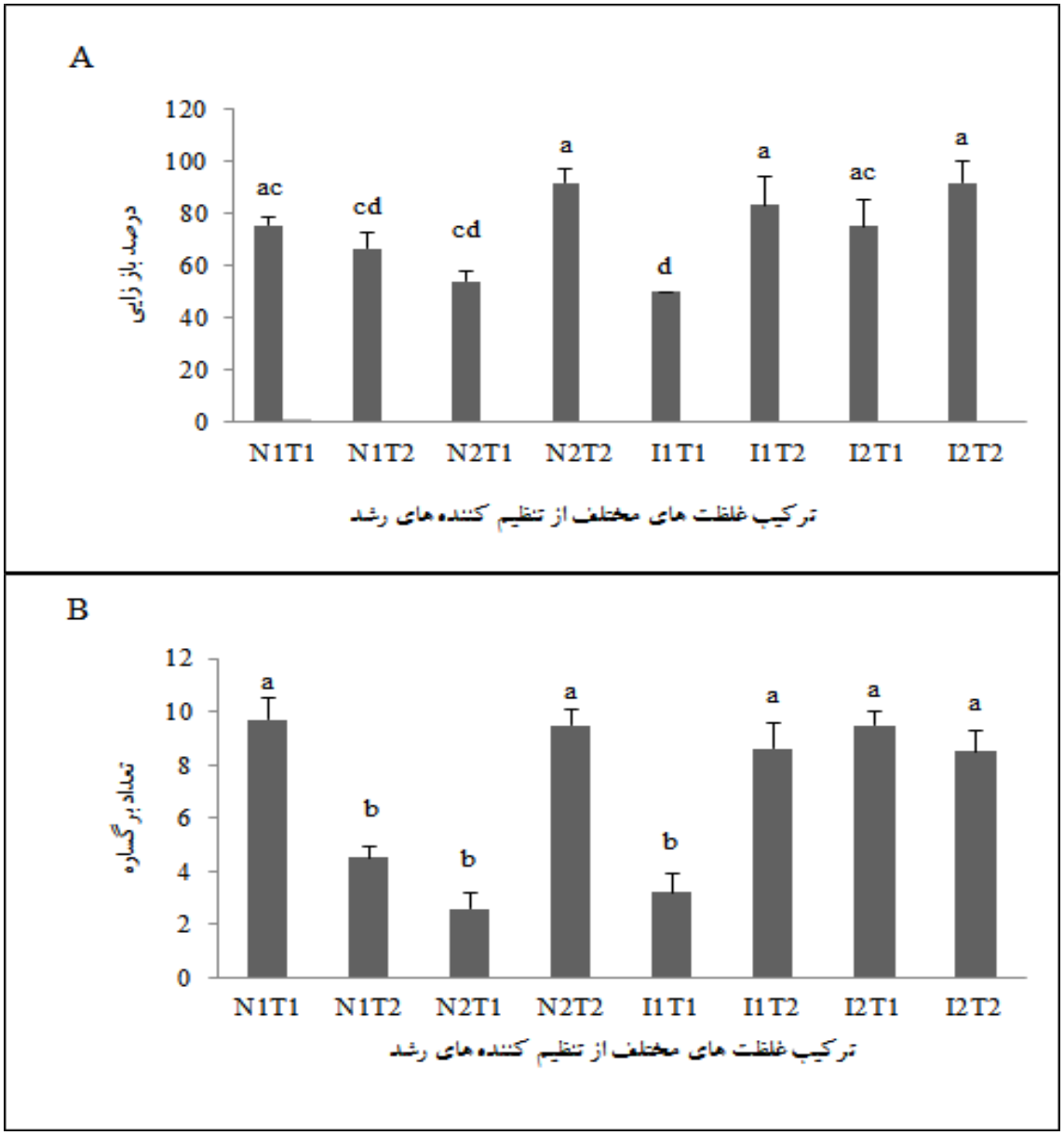
از اکسین‌ها در کنار سیتوکینین‌ها برای کالوس‌زایی در آلیوم‌ها استفاده می‌شود. در سیر، ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین به کالوس‌زایی منجر شد (El-Nil, 1977). مقایسهٔ تأثیر دو تنظیم‌کنندهٔ رشد ۱- نفتالن استیک اسید و 2,4-D در کالوس‌زایی در سیر نشان داد کالوس‌دهی در تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر ۱-نفتالن استیک اسید و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین ۳۷ درصد و در ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۶۵ درصد بود (Yan *et al*., 2009). با آنکه استفاده از 2,4-D به کالوس‌دهی بیشتری در آلیوم‌ها منجر می‌شود؛ اما به‌دلیل ایجاد جهش به‌دنبال کاربرد آن، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد جایگزین، مناسب‌تر است. در پژوهش حاضر، در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون، افزایش غلظت اکسین به ۱ میلی‌گرم بر لیتر به کاهش کالوس‌دهی منجر شد. نتایج پژوهشی بر سیر نیز نشان دادند غلظت زیاد ۱-نفتالن استیک اسید به کاهش تشکیل کالوس در این گیاه منجر شد (Kapoor *et al*., 2011). در پژوهش حاضر، در همهٔ غلظت‌های ۱- نفتالن استیک اسید افزایش سطح کاربرد بنزیل آدنین به کاهش کالوس‌زایی منجر شد؛ اما در تیدیازورون این اتفاق رخ نداد. نتایج بررسی انجام‌شده بر سیر نشان دادند غلظت‌های زیاد بنزیل آدنین به کاهش تشکیل کالوس منجر شدند (Barandiaran *et al*., 1999) که منطبق با نتایج بررسی حاضر بودند. بررسی‌ها همچنین نشان دادند غلظت‌های زیاد اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها از تقسیم سلول‌های مریستمی و کالوس‌زایی ممانعت کردند (Can *et al*., 2008).

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی والک: نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از به‌کارگیری ترکیبات مختلفی از اکسین‌ها و سیتوکینین بر باززایی والک نشان دادند تفاوت معنی‌داری میان تیمارهای مختلف در سطح ۱ درصد در باززایی غیرمستقیم از والک و میزان تولید برگساره وجود دارد. نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌ها (شکل ۲- A) نشان دادند بیشترین درصد باززایی، بین تیمارهای اعمال‌شده (۹۱/۶ درصد)، متعلق به تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول -۳- بوتیریک اسید با ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون بود که میزان آن با تیمارهای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید یا ۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول -۳- بوتیریک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون و نیز تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول -۳- بوتیریک اسید با ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون تفاوت معنی داری نداشت. کمترین درصد باززایی (۵۰ درصد) به ایندول -۳- بوتیریک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر با تیدیازورون با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تعلق داشت که تفاوت معنی‌داری در درصد باززایی با تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید به‌ترتیب با ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون نشان نداد.

بیشترین میزان تولید برگساره بین تیمارهای اعمال‌شده (۹/۷ برگ)، مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورن بود که تنها با تیمارهای ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید یا ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ایندول -۳- بوتیریک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون و نیز ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون که کمترین درصد تولید برگساره را تفاوت معنی‌دار نشان داد؛ اما با سایرین تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲- B).

باززایی، یکی از پدیده‌های تنظیم‌شونده با برهم‌کنش اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها است. غلظت مناسب هریک از این تنظیم‌کننده‌های رشد بسته به گیاه، شرایط کشت و نوع تنظیم‌کننده رشد متفاوت است (Gaspar *et al*., 1996; Haghighat Hour *et al*., 2012; Safarnejad *et al*., 2016). در بررسی حاضر، در تیمارهای حاوی مقادیر مساوی ۱- نفتالن استیک اسید و تیدیازورون، بیشترین درصد باززایی و تولید برگساره مشاهده شد و در ترکیب ایندول ۳- استیک اسید و تیدیازورون بجز زمانی که از کمترین غلظت هردو تنظیم‌کنندهٔ رشد استفاده شده بود، بیشترین درصد باززایی و تولید برگساره به دست آمدند. در پژوهشی که بر اکوتیپ‌های مختلف موسیر انجام شده بود، بیشترین باززایی در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید مشاهده شد (Farhadi *et al*., 2017). همچنین بیشترین مقدار تولید برگساره در بیشتر اکوتیپ‌های بررسی‌شده در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون به دست آمد (Farhadi *et al*., 2017). در بررسی باززایی *A. karataviense* مشاهده شد ترکیب سیتوکینین‌ها با ۱- نفتالن استیک اسید به افزایش میزان باززایی در این گیاه منجر شد (Kozak and Stelmaszczuk, 2013).

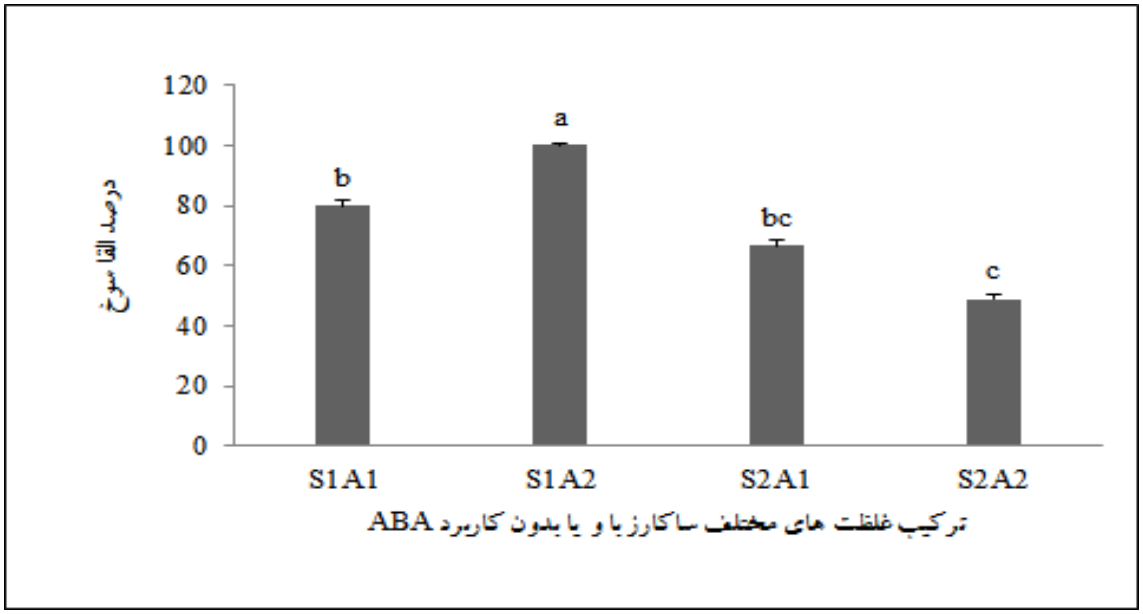
بین تیمارهای بررسی‌شده در پژوهش حاضر، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون به‌دلیل استفادهٔ



شکل ۲- مقایسهٔ درصد باززایی (A) و تولید برگساره (B) از کالوس والک در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد نفتالن ۳- استیک اسید (N) و ایندول ۳- بوتیریک اسید (I) با تیدیازورون (T)- N1 و N2 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن ۳- استیک اسید، T1 و T2 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و I1 و I2 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول ۳- بوتیریک اسید هستند. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ معنی‌داربودن میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۱ براساس آزمون دانکن هستند.

کمتر از تنظیم‌کننده‌های رشد تیماری مناسب برای باززایی و تولید برگساره در والک است.

تأثیر تنظیم‌کنندهٔ رشد و درصد ساکارز بر تولید سوخ در والک: نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان دادند اثر متقابل ساکارز و تنظیم‌کنندهٔ رشد بر تولید سوخ در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌ها (شکل ۳) نشان دادند بیشترین درصد تولید سوخ (۱۰۰ درصد) متعلق به

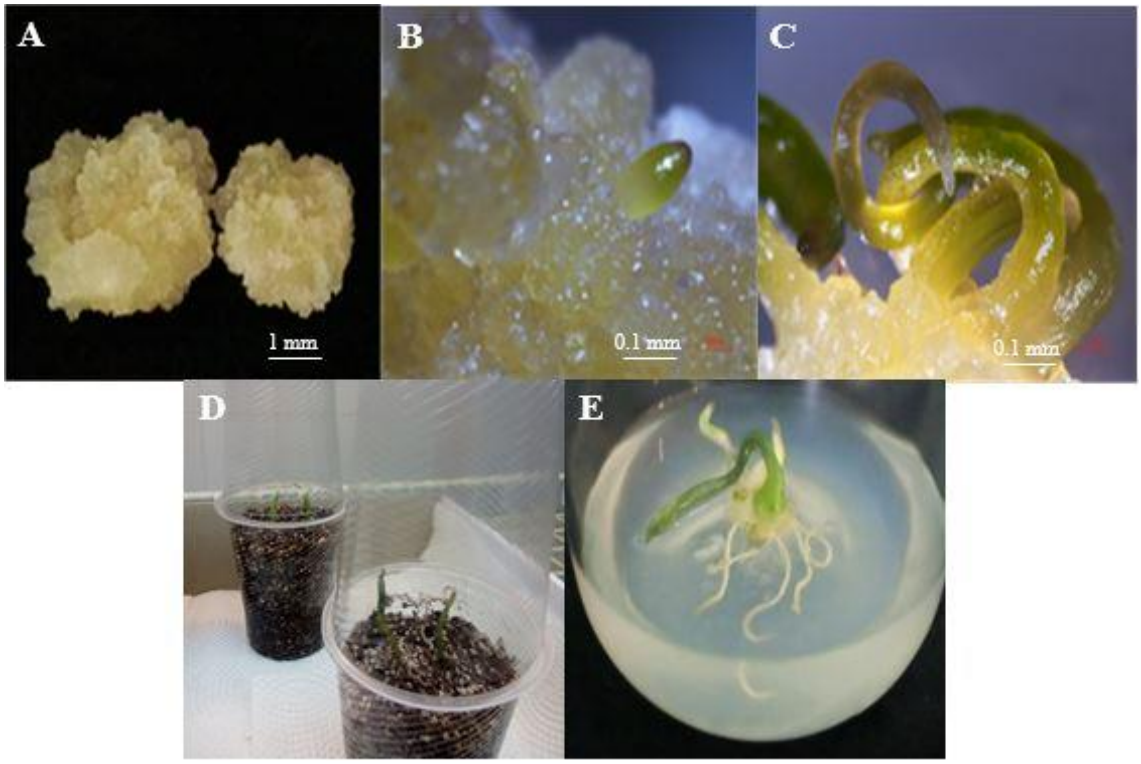


شکل ۳- مقایسهٔ اثر متقابل ساکارز و تنظیم‌کنندهٔ رشد آبسزیک اسید (ABA) بر تولید سوخ در والک- S1 و S2 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ غلظت‌های ۶ و ۱۰ درصد ساکارز و A1 و A2 به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ به کار نبردن ABA و کاربرد آن هستند. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ معنی‌داربودن میانگین‌ها در سطح P≤۰/۰۱ براساس آزمون دانکن هستند.

محیط کشت حاوی ۶ درصد ساکارز ۶ درصد با ۱ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید بود و کمترین آن (۴۸/۸ درصد) به محیط کشت حاوی ۱۲ درصد ساکارز با ۱ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید و نیز محیط کشت دارای ۱۲ درصد ساکارز و بدون آبسزیک اسید تعلق داشت.

بررسی‌ها نشان داده‌اند ساکارز یکی از عوامل مؤثر بر تشکیل سوخ در شرایط درون شیشه است؛ به‌دلیل اینکه سوخ، اندامی ذخیره‌ای است. در موسیر گزارش شد افزایش غلظت ساکارز تا ۶۰ گرم در لیتر، تولید سوخ را افزایش داد (Ghahremani *et al.*, 2010). در آزمایش حاضر، تأثیر تنظیم‌کنندهٔ رشد آبسزیک اسید در کنار استفاده از دو غلظت مختلف ساکارز بر والک بررسی شد. از آنجا که آبسزیک اسید، عامل ایجاد رکود در گیاه شناخته شده است و با کاهش رشد گیاه، امکان ذخیرهٔ مواد غذایی و تولید سوخ افزایش می‌یابد، به‌کارگیری این تنظیم‌کنندهٔ رشد در کنار ۶ درصد ساکارز بیشترین تولید سوخ را سبب شد. در پژوهش‌های قبلی، رابطهٔ سطح آبسزیک اسید با رکود و خواب گیاهان مختلف و تولید سوخ بررسی شده است (Djilianov *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994; Lukaszewska *et al.*, 1998). برای نمونه، نتایج پژوهشی بر لیلیوم نشان دادند استفاده از آبسزیک اسید افزایش تولید غده را در این گیاه باعث شد (Kim *et al.*, 1994). در پژوهش حاضر نیز محیط کشت حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز و یک میلی‌گرم بر لیتر آبسزیک اسید به بیشترین میزان تولید سوخ در والک منجر شد.

درنهایت، پس از کالوس‌زایی، باززایی، تولید برگساره و القای سوخ در برگساره‌ها، گیاهچه‌های سوخ‌دار والک تولیدشده به گلدان منتقل و مراحل سازگارکردن بر آنها انجام شدند (شکل ۴).



شکل ۴- استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد برای کالوس‌زایی، باززایی، تولید برگساره و تولید سوخ در والک: کالوس‌زایی در محیط‌کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (A)، باززایی گیاه در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (B)، تولید برگساره در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (C)، القای سوخ در محیط‌کشت حاوی ساکارز ۶ درصد با ۱ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید (D) و انتقال گیاهچه‌های تولیدشده به گلدان برای سازگاری (E)

جمع‌بندی

در پژوهش حاضر، تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی، باززایی و تولید سوخ در گیاه دارویی والک (*A. akaka*) بررسی شد. نتایج نشان دادند تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون در محیط‌کشت B5 و با ریزنمونهٔ صفحهٔ پایگاهی، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۳/۷ درصد) را داشت. همچنین تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید یا ایندول ۳- بوتیریک اسید با ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون بیشترین درصد باززایی (۹۱/۶ درصد) را نشان داد و بیشترین میزان تولید برگساره متعلق به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ۱- نفتالن استیک اسید با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (۹/۷ برگ) بود. برگساره‌های باززایی‌شده در محیط‌کشت B5 حاوی ۶ درصد ساکارز و ۱ میلی‌گرم در لیتر آبسزیک اسید بیشترین تولید سوخ (۱۰۰ درصد) را نشان دادند. نتایج بررسی حاضر نشان دادند با غلظت

و ترکیب‌های مناسب از تنظیم‌کننده‌های رشد کالوس‌دهی، باززایی و تولید سوخ در گیاه دارویی و ارزشمند والک افزایش می‌یابد.

سپاسگزاری

نگارندگان از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (INSF) بابت پرداخت هزینهٔ انجام پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Akhavan, A., Saeidi, H. and Fritsch, R. M. (2014) *Allium kuhrangense* (Amaryllidaceae) a new species of *Allium* sect. *Acanthoprason* from Iran. Phytotaxa 170(3): 213-218.

Banarus, S. (2014) *In vitro* selection of variants resistant to basal rot of garlic *(Allium sativum* L.*)* using induced mutations. Mycopath 11(2): 65-69.

Barandiaran, X., Martin, N., Rodriguez-Conde, M. F., Di Pietro, A. and Martin, J. (1999) An efficient method for callus culture and shoot regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). Scientia Horticulturae 34(2): 348-349.

Can, E., Celiktas, N. and Hatipoglu, R. (2008) Effect of auxin type and concentrations in different media on the callus induction and shoot formation of crested wheatgrass. Biotechnology and Biotechnology Equipment 22: 782-786.

Djilianov, D., Gerrits, M. M., Ivanova, A., Onckelen, H. A. and Klerk, G. J. M. (1994) ABA content and sensitivity during the development of dormancy in lily bulblets regenerated *in vitro*. Physiologia Plantarum 91(4): 639-644.

El-Nil, M. M. A. (1977) Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic *(Allium sativum* L.*)*. Journal of Plant Science Letters 9(3): 259-264.

Farhadi, N., Panahandeh, J., Azar, A. M. and Salte, S. A. (2017) Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). Scientia Horticulturae 218: 80-86.

Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Michaux-Ferriere, N. and Kahane, R. (2002) Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Reports 21: 197-203.

Fritsch, R. M. and Abbasi, M. (2013) A taxonomic review of *Allium* subg. *Melanocrommyum* in Iran. Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben.

Gamborg, O., Murashige, T., Thorpe, T. and Vasil, I. (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 12: 473-478.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M. and Thorpe, T. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology 32: 272-289.

Ghahremani, H., Dashti, F., Peery, K. and Yari, M. B. (2010) *In vitro* bulblet formation of mooseer (*Allium hirtifolium*). Plant Production Technology 1(2): 65-73 (in Persian).

Haghighat Hour, M., Asghari Zakaria, R. and Zare, N. (2012) Callus production and regeneration of medicinal plant *Papaver pseudo-orientale* under *in vitro* conditions. Iranian Journal of Plant Biology 10(3): 11-22 (in Persian).

Hassan, M., Haque, M. and Hassan, M. (2014) An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic *(Allium sativum* L.*)* using root tip as explant. Journal of the Bangladesh Agricultural University 12: 1-6.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. The Plant Cell 25: 3159-3173.

Kamenetsky, R. and Rabinowitch, H. D. (2006) The genus *Allium*: a developmental and horticultural analysis. Horticultural Reviews 32: 329-378. Kapoor, R., Nasim, S. A., Zafar, M. and Mujib, A. (2011) Establishment of efficient method for callus culture and shoot regeneration of local Indian garlic (var. Yamuna safed). Journal of Ecobiotechnology 3(12): 14-17.

Khan, N., Alam, M. and Nath, U. (2004) *In vitro* regeneration of garlic through callus culture. Biological Sciences 4: 189-191.

Kim, K. S., Davelaar, E. and Klerk, G. J. (1994) Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. Physiologia Plantarum 90(1): 59-64.

Kozak, D. and Stelmaszczuk, M. (2013). Comparison of *Allium aflatunense* B. Fedtsch. purple sensation, and *Allium karataviense* Regel. ivory queen, regenerative capabilities in tissue culture. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus 12(6): 197-213.

Luciani, G. F., Mary, A. K., Pellegrini, C. and Curvetto, N. (2006) Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 87: 139-143.

Lukaszewska, A. J., Witomska, M., Bianco, J. and Barthe, P. (1998) ABA contents and the regeneration ability of *Fritillaria imperialis* L. cultured *in vitro*. Acta Physiologiae Plantarum 20: 241-244.

Memariani, F., Joharchi, M. R. and Arjmandi, A. A. (2012) *Allium aladaghense* (Amaryllidaceae, Allieae), a new species of section *Asteroprason* from northeast of Iran. Phytotaxa 56(1): 28-34.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Myers, J. and Simon, P. (1999) Regeneration of garlic callus as affected by clonal variation, plant growth regulators and culture conditions over time. Plant Cell Reports 19: 32-36.

Safarnejad, A., Alamdari, S., Darroudi, H. and Dalir, M. (2016) The effect of growth regulators (BAP and IBA) on regeneration, proliferation and rooting of Natanz pears plant using *in vitro* technique. Iranian Journal of Plant Biology 29(8): 77-90 (in Persian).

Toaima, N., Novak, E. and Schumann, G. (2003) Callus induction from different explants of commercial cultivars of leek, *Allium ampeloprasum* var. Porrum L. Acta Horticulturae 597: 303-309.

Vazquez-Prieto, M. A. and Miatello, R. M. (2010) Organosulfur compounds and cardiovascular disease. Journal of Molecular Aspects of Medicine 31(6): 540-545.

Yan, M. M., Xu, C., Kim, C. H., Um, Y. C., Bah, A. A. and Guo, D. P. (2009) Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae 123(1): 124-128.

Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A. and Hafiz, I. A. (2013) Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. Molecular Biology Reports 40: 2837-2849.