

دورگ گیری بین گونه‌ای سوسن چلچراغ و ارقام تجاری لیلیوم با روش گرده‌افشانی خامه قطع شده و کشت قطعات تخمدان

حجت اله عباسی^۱، روح انگیز نادری^{۲*}، محسن کافی^۲، پژمان آزادی^۳ و محمد تقی پاداشت دهکایی^۴
۱ و ۲. دانشجوی دکتری فیزیولوژی و اصلاح گل و گیاهان زینتی و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار، مؤسسه بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
۴. استادیار بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸)

چکیده

در این پژوهش، کارایی استفاده از روش گرده‌افشانی خامه قطع شده و کشت قطعات تخمدان جهت غلبه بر موانع ناسازگاری پیش‌تخمی و پس‌تخمی لیلیوم مورد ارزیابی قرار گرفت. سه رقم از گونه‌های آسیایی (ترسور، پیراندلو و سب دازل) و چهار رقم از گونه‌های اوریتال (ریالتو، سوربونه، پارادرو و مانسیا) به‌عنوان والد مادری و گونه *Lilium ledebourii* (سوسن چلچراغ) به‌عنوان والد دهنده دانه گرده با دو روش گرده‌افشانی عادی و گرده‌افشانی خامه قطع شده تلاقی داده شدند. تخمدان‌ها پس از ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز از گرده‌افشانی جدا شده و کشت قطعات تخمدان انجام شد. پژوهش به‌صورت دو آزمایش گرده‌افشانی کلالة و گرده‌افشانی خامه قطع شده انجام شد. این پژوهش به‌صورت طرح کاملا تصادفی و در قالب آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور زمان برداشت تخمدان و رقم مورد استفاده انجام شد. میزان تورم تخمدان، تعداد کپسول به‌دست آمده، وزن کپسول‌های تولیدشده، تعداد قطعات کشت‌شده، تعداد بذر تولیدی، وزن بذر به‌دست آمده و تعداد بذر جوانه‌زده ثبت شد. به‌علت عدم موفقیت آزمایش گرده‌افشانی کلالة نتایج حاصل در این مقاله گزارش نشد. نتایج نشان داد که فاکتور رقم در تمام شاخص‌ها در سطح ۵ درصد و در شاخص تعداد کپسول در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است. اثر فاکتور زمان‌های مختلف برداشت تخمدان و اثر متقابل این فاکتور با فاکتور رقم تنها در مورد شاخص تعداد بذر به‌دست آمده در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. در آزمایش گرده‌افشانی خامه قطع شده در تلاقی بین سوسن چلچراغ و ارقام مانسیا، ترسور و سوربون به‌ترتیب ۱۷۲، ۸۰ و ۶۰ عدد بذر تولیدشده و ۱/۱ درصد از بذرهای برداشت‌شده از پایه مادری مانسیا جوانه‌زده و به گیاهچه تبدیل شدند. به‌طور کلی در این آزمایش مشخص شد که از تکنیک گرده‌افشانی خامه قطع شده و به‌دنبال آن نجات جنین‌های به‌دست آمده می‌توان جهت غلبه بر موانع دورگ‌گیری در سوسن چلچراغ و ارقام تجاری استفاده نموده و ارقام جدیدی را تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: موانع پیش‌تخمی، ناسازگاری، نجات جنین، هیبریداسیون.

Interspecific hybridization between *Lilium ledebourii* and commercial cultivars of lilyum by cut-style method and ovary slice culture

Hojatollah Abbasi¹, Roohangiz Naderi^{2*}, Mohsen Kafi², Pejman Azadi³ and Mohammad Naghi Padasht Dahkaei⁴
1, 2. Ph.D. Candidate of Physiology and Breeding of Ornamental Plants and Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran
4. Assistant Professor of Horticulture Crops Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran
(Received: Oct. 9, 2017 - Accepted: Feb. 7, 2018)

ABSTRACT

Benefits of cut style method and ovary slice culture for overcoming pre-and post-zygotic barriers in lily crossing were studied. Three Asiatic hybrid cultivars (Tressor, Pirandello and Ceb duzzel) along with four cultivars of Oriental section (Rialto, Sorbonne, Paradero and Manissa) were used as maternal plants. *Lilium ledebourii* has selected as pollen donor plant to cross with maternal plants using stigma pollination or cut style pollination methods. Harvesting of produced capsules for ovary slice culture was done after 10, 20 and 40 days. Ovary expansion index, number of produced capsules, capsule weight, and number of cultured slices, number of produced seeds, seed weight and number of germinated seeds were recorded. Results indicated that cultivar had significant influence on all recorded parameters. The number of seeds was significantly affected by capsule harvesting time ($p < 0.05$). In cut style experiment in crosses between *Lilium ledebourii* and Mannisa, Tressor and Sorbonne 172, 80 and 60 seeds were produced respectively. The rate of seed germination for Mannisa by *L. ledebourii* was 1.1 percent. In stigma pollination experiment capsules were expanded but none of them produced viable seeds. Totally, in this experiment, use of CSM pollination method was successful for by passing pre-zygotic barriers in lily interspecific crossing.

Keywords: Embryo rescue, hybridization, incompatibility, pre-zygotic barriers.

* Corresponding author E-mail: rnaderi@ut.ac.ir

مقدمه

مانند مقاومت به سرما، گرما، مقاومت به نورکم، تعداد گل بالا، شکل و طرح منحصر به فرد و یا ترکیبات رنگی مشخص پیدا شده است. یکی از این گونه‌ها سوسن چلچراغ بوده که به‌عنوان گل ملی ایران شناخته شده و تنها گونه لیلیوم بومی ایران است. این گیاه دارای صفات بسیار کم نظیری مانند: مقاومت به دمای پایین، تعداد گل بسیار بالا، عمر پس از برداشت طولانی، شکل و رنگ منحصر به فرد و ساقه گل بسیار مستحکم و بلند بوده که می‌توان از این گونه و صفات برجسته آن در برنامه‌های اصلاح لیلیوم بهره گرفت (Mirmassuomi *et al.*, 2013). جهت غلبه بر موانع پیش‌تخمی از تکنیک‌هایی مانند گرده‌افشانی خامه قطع‌شده، پیوندزدن خامه سازگار، گرده‌افشانی جفت و گرده‌افشانی درون‌شیشه‌ای استفاده می‌شود (Willemse *et al.*, 1995; Van Tuyl *et al.*, 1991). روش‌هایی مانند تکنیک نجات‌جنین، کشت قطعات تخمدان و کشت تخمک نیز جهت برطرف کردن موانع پس‌تخمی استفاده شده است (Okazaki *et al.*, 1994; Van Tuyl *et al.*, 1991). با غلبه بر این مانع، تلاقی‌های بین‌گونه‌ای لیلیوم تولید شده و در نتیجه آن ارقام هیبرید بین‌گونه‌ای بسیار زیادی در این گیاه تولید شده است (Van Tuyl *et al.*, 1997). در یک برنامه اصلاحی تلاقی‌های بین‌گونه‌ای هیبریدهای آسیایی ارقام گولف^۴، پلی‌آنا^۵ و جیرونده^۶، با هیبریدهای اورینتال رقم لومباردیا^۷ و هیبریدهای عید پاک رقم وایت‌هیون^۸ و وایت‌مجیک^۹ مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش جهت غلبه بر موانع قبل از لقاح، از تکنیک قطع خامه و برای جلوگیری از بروز موانع بعد از تلاقی از کشت قطعات تخمدان استفاده گردید، نتایج نشان داد که درصد تورم تخمدان در تلاقی بین گونه‌های آسیاتیک و اورینتال ۷۵ درصد، اورینتال و عید پاک ۶۹ درصد و آسیاتیک و عیدپاک ۵۹ درصد بوده است. با افزایش تعداد روز از

لیلیوم با نام علمی (*Lilium spp.*) از خانواده Liliaceae به‌عنوان یکی از مهمترین جنس‌های گیاهان پیازی در دنیا شناخته شده است. کشور هلند بیشترین سطح زیرکشت این گیاه به‌میزان ۴۵۰۰ هکتار را به خود اختصاص داده است. اکثر ارقام موجود لیلیوم حاصل تلاقی بین‌بخشی بوده که این بخش‌ها به سه دسته مهم: آسیاتیک^۱، لانگیفلوروم^۲ و اورینتال یا شرقی^۳ طبقه‌بندی می‌شوند. هر کدام از این بخش‌ها دارای صفات منحصر به فرد بوده که در اصلاح لیلیوم از آنها استفاده شده است. گونه‌های لانگیفلوروم دارای گل‌های بزرگ زنگوله‌ای شکل بوده و رایحه بسیار قوی دارند. همچنین در تمام طول سال می‌توان این گونه‌ها را به‌آسانی پیش‌رس نمود. ارقام لانگیفلوروم حساسیت بسیار بالایی در مقابل قارچی فوزاریوم و ویروس‌های گیاهی دارند. گونه‌های آسیاتیک دارای دامنه رنگی بسیار گسترده (رنگ‌های نارنجی، زرد، صورتی، قرمز و ارغوانی) بوده، همچنین از نظر گلدهی نیز دارای ارقام زودرس و دیررس می‌باشند (Woodcock & Stearn, 1950). در عین حال این ارقام به بیماری قارچی فوزاریوم، که سبب پوسیدگی پیاز لیلیوم می‌شود، مقاومت دارند (McRae, 1998). گونه‌های اورینتال دارای رنگ‌های زرد، سفید و صورتی با رایحه بسیار دلپذیر بوده و اکثر آنها به بیماری قارچی بوتریتیس مقاومت نشان می‌دهند (McRae, 1998). تلاقی گونه‌های درون این بخش‌ها موفقیت‌آمیز بوده و منجر به نتایج بارور می‌گردد (Van Tuyl *et al.*, 2000). از سوی دیگر تلاقی بین گونه‌های موجود در این بخش‌ها در اغلب موارد موفقیت‌آمیز نبوده و به‌علت وجود موانع پیش‌تخمی و پس‌تخمی که در جنس لیلیوم وجود دارد، با شکست مواجه می‌گردد (Zhou *et al.*, 2008). تمام گونه‌های وحشی لیلیوم به‌جز گونه *Lilium bulbiflorum* که تریپلوئید است، دارای سطح پلوئیدی دیپلوئید $2n=2x=24$ بوده و در بین آنها گونه‌هایی با صفات مناسب اصلاحی

4. Gulph
5. Poliana
6. Gironde
7. Lombardia
8. Wight Haven
9. Wight Magic

1. Asiatic hybrid
2. Longiflorum
3. Oriental hybrid

شرکت داده شدند. در این آزمایش مشخص شد که کپسول‌های به‌دست‌آمده از تلاقی بین ارقام تریپلویدی و دیپلوید اورینتال قوی‌تر و بزرگ‌تر از کپسول‌های تولید شده در تلاقی بین ارقام تریپلویدی و گونه رگال بودند. در تلاقی‌های انجام‌شده بین OTO×OO (هیبرید اورینتال و ترومپت با اورینتال) در نهایت ۸۱ دانه‌ال از این بذور به‌دست آمد درحالی‌که هیچ کدام از تلاقی‌های انجام‌شده بین OTO×TT (هیبرید اورینتال و ترومپت با ترومپت) موفقیت‌آمیز نبود (Zhou *et al.*, 2014). تلاقی‌های بین‌گونه‌ای با استفاده از تکنیک‌های نجات جنین و پلی‌پلوئیدی امکان ایجاد هیبریدهای جدید را فراهم ساخته است؛ اگرچه تولید ارقام مقاوم به بیماری‌ها همچنان در لیلیوم یک چالش است و استفاده از گونه‌های وحشی در برنامه‌های به‌نژادی می‌تواند منجر به تولید ارقام جدید شود (Bakhshae *et al.*, 2016). تحقیق حاضر با هدف امکان‌سنجی استفاده از سوسن چلچراغ در برنامه‌های اصلاحی لیلیوم و همچنین قابلیت استفاده از تکنیک گرده‌افشانی خامه قطع‌شده و نجات جنین جهت عبور از موانع تلاقی این گونه با ارقام تجاری انجام شد.

مواد و روش‌ها

جوانه‌زنی دانه گرده

جهت اطمینان از سلامت و جوانه‌زنی دانه گرده از آزمون رنگ‌آمیزی با استوکارمن با استفاده از روش پیشنهادی شیوانا و تاندون (Shivanna & Tandon, 2014) و جوانه‌زنی درون‌شیشه‌ای دانه گرده نیز از روش Van Tuyl *et al.* (2002) استفاده شد.

مواد گیاهی

سوخ ارقام لیلیوم آسیاتیک (سب دازل^{۱۵}، پیراندلو^{۱۶} و ترسور^{۱۷}) و ارقام لیلیوم اورینتال (پارادرو^{۱۸}، ریالتو^{۱۹}، سوربون^{۲۰} و مانیسا^{۲۱}) از کشور هلند و در سال ۲۰۱۶

گرده‌افشانی تا کشت قطعات تخمدان از ۱۴ تا ۲۱ روز تقریباً تمام تخمک‌ها سقط شدند. در پایان آزمایش سه درصد از تخمک‌های موجود در تخمدان‌های متورم‌شده جوانه زده و ۲۷ گیاهچه جدید به‌دست آمد (Grassuti *et al.*, 2010). در تحقیقی دیگر تلاقی‌پذیری ۱۰ رقم از هیبریدهای آسیایی، هشت رقم از هیبریدهای ترومپت و نه رقم از هیبریدهای اورینتال و گونه‌های کندیدوم^۱، مونادلفوم^۲، رگال^۳، هایبری^۴، پومیوم^۵ و مارتاگون^۶ به‌عنوان والد گرده دهنده مورد بررسی قرار گرفت. تلاقی بین دو رقم توسکانا^۷ و بل‌ایمی^۸ از هیبریدهای آسیایی با گونه پومیوم با هر دو روش گرده‌افشانی کلاله طبیعی و گرده‌افشانی خامه قطع‌شده موفقیت‌آمیز بود. تعداد ۱۵ گیاهچه از تلاقی بین گونه پومیلا و رقم توسکانا و ۲۰ گیاهچه از تلاقی بین پومیلا و بل‌ایمی به‌دست آمد. هنگامی که گونه مارتاگون توسط گرده ارقام لالی‌پاپ^۹، استونز^{۱۰} و توسکانا گرده‌افشانی شد، در حدود ۱۰ گیاهچه به‌دست آمد. از تلاقی دوطرفه هیبریدهای آسیایی و گونه‌های کندیدوم و هایبری و ارقام موجود بین هیبریدهای ترومپت و اورینتال و از تلاقی گونه مارتاگون با ارقام ترومپت و اورینتال موفقیتی حاصل نشد (Prosevičius & Strikulyte, 2004). در مطالعه‌ای قابلیت استفاده از ارقام تریپلوید به‌عنوان والد مادری در تلاقی بین ارقامی با سطوح پلوئیدی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سه رقم تریپلوید بلادونا^{۱۱}، کندی‌کلاب^{۱۲} و تراواترو^{۱۳} از ارقام OT (تلاقی بین اورینتال و ترومپت) و دو رقم دیپلوید سایبریا^{۱۴} و سوربونه از ارقام اورینتال و گونه دیپلوید رگال به‌عنوان والد دیپلوید وحشی در تلاقی

1. *Lilium candidum*
2. *L. monadelphum*
3. *L. regale*
4. *L. henryi*
5. *L. pumilum*
6. *L. martagon*
7. Toscana
8. Bell Aimy
9. Lalypop
10. Stonse
11. Bladonna
12. Candy Club
13. Travatero
14. Siberia

15. Ceb Duzzel
16. Pirandello
17. Tressor
18. Paraderro
19. Rialto
20. Sorbonne
21. Mannisa

محیط کشت

در این تحقیق جهت کشت قطعات تخمدان از محیط کشت MS کامل (Murashige & Skoog, 1968) همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالیک‌استیک‌اسید (NAA)، ۵ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار استفاده شد (Fukai *et al.*, 2005). محیط کشت دوم که جهت کشت تخمک‌های متورم مورد استفاده قرار گرفت، شامل MS کامل با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۵ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار بود. محیط کشت سوم که جهت رشد و پرآوری گیاهچه‌ها مورد استفاده قرار گرفت نیز شامل MS کامل به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین (BA)، ۶ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار بود (Fukai *et al.*, 2004). در هر کدام از ظروف کشت شیشه‌ای ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت توزیع شده و سپس در دستگاه اتوکلاو و دمای ۱۲۱ درجه، فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند.

این آزمایش به صورت دو آزمایش مستقل هر کدام به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی در این آزمایش شامل نوع رقم و زمان برداشت تخمدان بودند. صفاتی از جمله: میزان تورم تخمدان، تعداد کپسول به دست آمده، وزن کپسول‌های تولیدشده، تعداد قطعات تخمدان کشت شده، تعداد بذر تولیدی، وزن بذور به دست آمده و تعداد بذر جوانه زده ثبت شده و نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS (V.22) آنالیز شده. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شده و نمودارها با نرم‌افزار Excel (2016) رسم شدند.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش زنده‌مانی دانه کرده نشان داد که ۸۰ درصد کرده‌ها فعال بوده و در زیر میکروسکوپ به رنگ قرمز مشاهده شدند. در این آزمایش کرده‌های غیرزنده توانایی جذب رنگ استوکارمن را نداشته و به رنگ زرد دیده می‌شدند. در آزمایش بررسی جوانه‌زنی نیز مشخص شد که پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت کرده‌ها روی محیط کشت، ۶۵ درصد از آنها جوانه زده و لوله کرده رشد یافته در آنها قابل مشاهده بود.

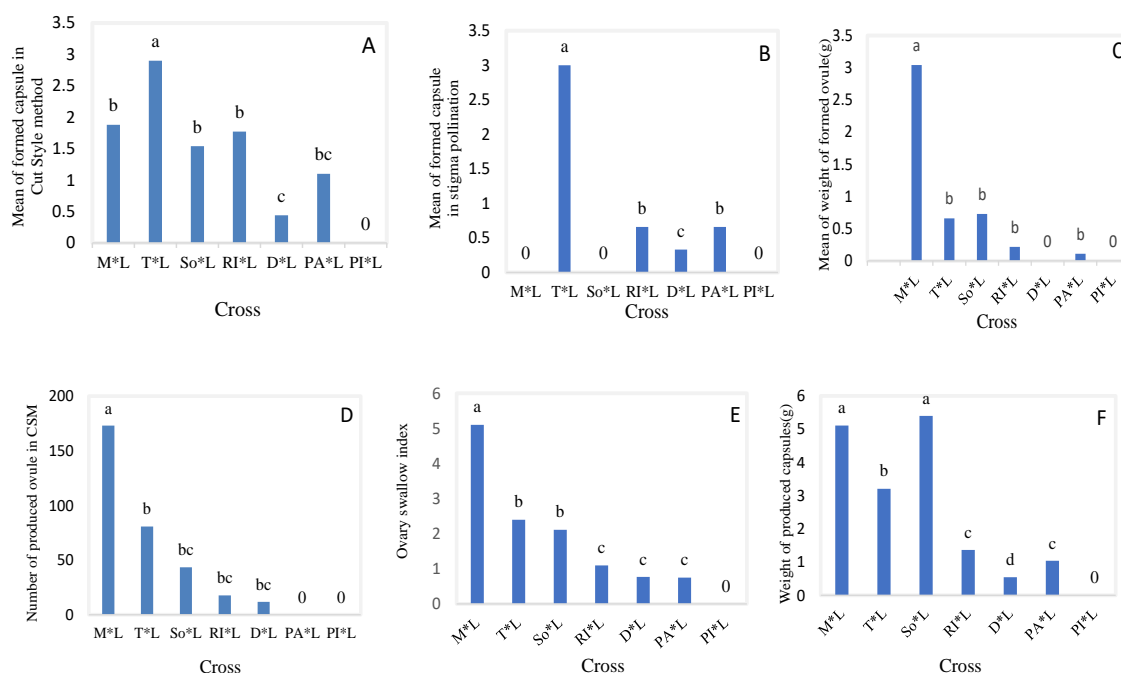
وارد شده و پس از تیمار با قارچکش کاربندازیم در بستر کوکویت و پرلیت با نسبت ۳۰:۷۰ و در گلخانه تجاری واقع در شهرستان کرج با دمای روزانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد و دمای شبانه ۱۵ تا ۱۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. سوخ‌ها با روش آبیاری قطره‌ای آبیاری شده و هر سه روز یکبار با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. پس از رسیدن گیاهان به زمان گلدهی، عملیات اخته‌سازی انجام گرفت، به این صورت که یک روز قبل از شکوفایی، غنچه گل به صورت مصنوعی شکافته شده و بساک‌های آن جدا شده و مادگی به صورت کامل درون فویل آلومینیومی قرار داده شد. سه روز بعد از اخته‌سازی، پوشش فویل آلومینیومی برداشته شده و کلاله پذیرا در صورت وجود با گرده تازه و در غیر این صورت با گرده ذخیره شده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد، گرده‌افشانی شده و این عمل ۲۴ ساعت بعد مجدداً تکرار شد. در مورد آزمایش گرده‌افشانی قطع شده نیز، پس از سه روز از زمان اخته‌سازی، خامه گیاهان مورد نظر از دو میلی‌متری بالای تخمدان بریده شده و گرده‌ها روی قسمت بریده شده قرار داده شدند. در این آزمایش جهت جوانه‌زنی مناسب روی گرده‌ها یک یا دو قطره از محلول شبیه‌سازی شده ترشحات کلاله که شامل ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر اسید بوریک و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کلسیم بود، ریخته شده و این کار نیز پس از ۲۴ ساعت تکرار شد. پس از گذشت مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز از گرده‌افشانی، کپسول‌های به دست آمده برداشت شده و کشت قطعات تخمدان انجام شد. به این صورت که ابتدا کپسول‌های برداشت شده با آب شسته شده و سپس به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. کپسول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۳ درصد استریل شده و در زیر هود لامینار به قطعات عرضی یک میلی‌متری تقسیم شده و در محیط کشت با در نظر داشتن قطبیت آنها قرار داده شدند. پس از گذشت ۴۰ روز، تخمک‌های متورم شده به محیط کشت جوانه‌زنی منتقل شده و پس از گذشت ۵ ماه که جوانه‌زنی مشاهده شد، به محیط رشد و پرآوری منتقل شدند.

گرده تا اواسط خامه پیش می‌رود. جوانه‌زنی دانه گرده و افزایش طول لوله گرده باعث تولید هورمون اکسین در مادگی شده و این هورمون باعث عدم از بین رفتن بافت تخمدان و رشد آن می‌شود که نتایج مشابهی در بررسی‌های انجام‌شده توسط پامارس- ویسیانا در گیاه کدوی مسمایی نیز گزارش شده است (Pomares- Viciana, 2017). اولین گزارش منتشرشده در مورد پارتنوکاری گیاه لیلیوم توسط Beal (1943) منتشر شد. این محقق اثبات کرد که با کاربرد هورمون اکسین روی کلاله گرده‌افشانی‌نشده، می‌توان از سقط زود هنگام آنها جلوگیری نموده و میوه‌های پارتنوکارپ تولید کرد. در گرده‌افشانی کلاله قطع‌شده در تمام تلاقی‌ها به‌جز تلاقی رقم پیراندلو و سوسن چلچراغ، کپسول تولید شد که گویای ناسازگاری بسیار پیشرفته بین این رقم و سوسن چلچراغ است که حتی با وجود استفاده از این تکنیک نیز قابل برطرف شدن نیست. در این تلاقی با وجود استفاده از تکنیک قطع خامه، توانایی تولید کپسول بارور مشاهده نشده و تمام تخمدان‌های گرده‌افشانی‌شده پس از ۶ روز از بین رفتند. آثار سقط جنین که با علایمی مانند تغییر رنگ ناگهانی از سبز به زرد و چروکیدگی تخمدان و در نهایت توقف رشد تخمدان همراه بود، در این تلاقی قابل مشاهده بود. بیشترین تعداد کپسول تولیدشده در تلاقی بین رقم ترسور و سوسن چلچراغ (۳ عدد) مشاهده شد و ارقام مانسیا، ریالتو و سوربون به ترتیب در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند (شکل ۱-A). همان‌گونه که در آزمایش گرده‌افشانی کلاله عادی نیز مشاهده شد، در اینجا نیز تولید کپسول بیشتر، تضمین‌کننده انجام تلاقی مؤثر نبوده و تعداد تخمک جدا شده و وزن آنها بسیار کمتر از تلاقی 'مانسیا' و سوسن چلچراغ بود (جدول ۲). کپسول‌های به‌دست‌آمده در تلاقی بین 'ترسور' و سوسن چلچراغ دارای اندازه کوچک‌تر بوده و همچنین مقدار کمتری از تخمدان‌های آنها متورم شده بودند. به این صورت که تقریباً بیش از ۳۰ درصد تخمدان‌ها فاقد تخمک بودند. دلایل زیادی برای توجیه این پدیده وجود دارد که از مهمترین آن می‌توان به گرده‌افشانی ناقص، عدم توانایی پایه مادری در نگهداری تخمک بارور شده و یا تکامل ناقص آندوسپرم اشاره نمود (Zhang et al., 2012). بیشترین تعداد

نتایج مقایسه میانگین اثر رقم بر تولید کپسول در گرده‌افشانی عادی کلاله نشان داد که بیشترین تعداد کپسول به‌دست‌آمده در ترکیب تلاقی رقم ترسور با سوسن چلچراغ به‌دست‌آمده است. در این تلاقی از بین ۱۰ تخمدان گرده‌افشانی‌شده تعداد ۳ کپسول به‌دست آمد. در تلاقی‌های دیگر این تعداد کمتر بوده، به‌نحوی که هنگامی که ارقام ریالتو، دازل و پارادرو به‌عنوان والد مادری به‌کار برده شدند، تقریباً یک کپسول به‌ازای هر تلاقی به‌دست آمد و از سوی دیگر از تلاقی بین ارقام مانسیا، سوربون و پیراندلو با سوسن چلچراغ هیچ کپسولی تولید نشد (شکل ۱-C). نتایج مشابه تحقیق حاضر نیز در پژوهش انجام‌شده توسط Grassotti et al. (2010) به‌دست آمد. این محققین گزارش کردند که گونه‌های مختلف و یا حتی ارقام مختلف یک گونه از نظر قابلیت تلاقی‌پذیری واکنش متفاوتی را نشان می‌دهند. نکته قابل توجه در گرده‌افشانی عادی کلاله این بود که علی‌رغم تولید کپسول و افزایش اندازه کپسول‌های تولیدشده، در مرحله کشت قطعات تخمدان، این قطعات پس از مدتی قهوه‌ای‌رنگ شده و از بین رفته و یا بذره‌های بارور تولید نکردند. این تخمک‌ها در مقایسه با تخمک‌های به‌دست‌آمده در گرده‌افشانی خامه قطع شده، دارای اندازه بسیار کوچکتر و رنگ بسیار شفاف‌تر بودند. همان‌گونه که در تحقیقات در زمینه اصلاح لیلیوم اشاره شده است، امروزه تقریباً در تمام تلاقی‌های بین‌گونه‌ای، استفاده از تکنیک قطع خامه جهت عبور از موانع پیش از تلقیح ضروری است (Van Tuyl & De Jeu, 1997). در پژوهش حاضر نیز مشخص شد که بین ارقام مورد استفاده و سوسن چلچراغ ناسازگاری پیش‌تلقیحی شدیدی وجود داشته که می‌بایست با روش قطع خامه این ناسازگاری برطرف شود. در مورد کپسول‌های تولید شده در گرده‌افشانی کلاله نیز این‌چنین به‌نظر می‌آید که در این کپسول‌ها صرفاً دیواره تخمدان رشد نموده و افزایش حجم آنها ناشی از افزایش حجم تخمک بارور نبوده است. از جمله دلایل این پدیده می‌توان به رابطه متقابل بین دانه گرده و مادگی اشاره نمود، به این صورت که گرده مورد نظر روی کلاله جوانه زده و لوله

بیشترین مقدار در حدود ۳ گرم به ثبت رسید (شکل ۱-D؛ جدول ۱). فاکتور زمان برداشت تخمدان، تنها بر تعداد تخمک‌های جدا شده در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد و بر سایر پارامترهای مورد بررسی اثر معنی‌داری نداشت. در این آزمایش مشخص شد که در بین زمان‌های برداشت تخمدان، زمان اول (۱۰ روز بعد از گرده افشانی) بیشترین تعداد تخمک را تولید کرده است. تأثیر متقابل زمان و رقم نیز تنها در مورد شاخص تعداد تخمک‌های برداشت‌شده در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود و بر سایر شاخص‌های مورد بررسی تأثیر معنی‌داری نداشت. پس از گذشت چهار ماه از زمان انتقال تخمک‌ها به محیط کشت جوانه‌زنی، تنها دو عدد از تخمک‌های حاصل از تلاقی 'مانیسا' و 'لدبوری' جوانه زده و تبدیل به گیاهچه شدند.

تخمک به‌دست‌آمده در تلاقی بین 'مانیسا' و سوسن چلچراغ به ثبت رسید. در این تلاقی تعداد ۱۷۲ تخمک از تخمدان جدا شده و در محیط کشت جوانه‌زنی کشت شدند. کپسول به‌دست‌آمده در این تلاقی دارای اندازه طبیعی بوده و تخمک‌هایی به رنگ زرد کم‌رنگ و با دیواره برجسته تولید کرد. در تلاقی 'پارادرو' با سوسن چلچراغ علی‌رغم تولید کپسول، تمام تخمک‌ها سقط شده و از بین رفتند. در تلاقی بین 'ترسور' و سوسن چلچراغ، تعداد ۸۰ عدد و در تلاقی بین 'سوربون' و سوسن چلچراغ تعداد ۶۰ عدد تخمک تولید شده و به محیط کشت جوانه‌زنی انتقال یافتند (شکل ۱-B). شاخص میانگین وزن تخمک‌های جدا شده در تلاقی بین 'مانیسا' و سوسن چلچراغ دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد بوده و



شکل ۱. مقایسه میانگین شاخص‌های مورد بررسی در تلاقی بین سوسن چلچراغ به‌عنوان والد گرده‌دهنده و ارقام مانیسا (M)، ترسور (T)، سوربون (So)، ریالتو (RI)، سب دازل (D)، پارادرو (PA) و پیراندلو (PI) به‌عنوان والد مادری. (ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند)

(A) میانگین تعداد کپسول تولیدشده در گرده‌افشانی خامه قطع‌شده، (B) میانگین تعداد کپسول به‌دست‌آمده در گرده‌افشانی عادی، (C) تعداد تخمک تولیدشده، (D) میانگین وزن تخمک‌های تولیدشده، (E) شاخص تورم تخمدان، (F) وزن کپسول‌های به‌دست‌آمده.

Figure 1. Means comparison of evaluated traits in crosses between *Lilium ledebourii* as a donor parent and commercial cultivars: Manissa (M), Tressor (T), Sorbonne (So), Rialto (R), Ceb Duzzel (D), Paradero (PA) and Pirandello (PI) as maternal plants. (Similar letters on columns indicate no significant difference at 5% of probability level).

A) Mean of formed capsule in Cut Style method, B) mean of formed capsule in stigma pollination, C) mean of weight of formed ovule, D) number of produced ovules, E) ovary expansion index, F) weight of produced capsules.

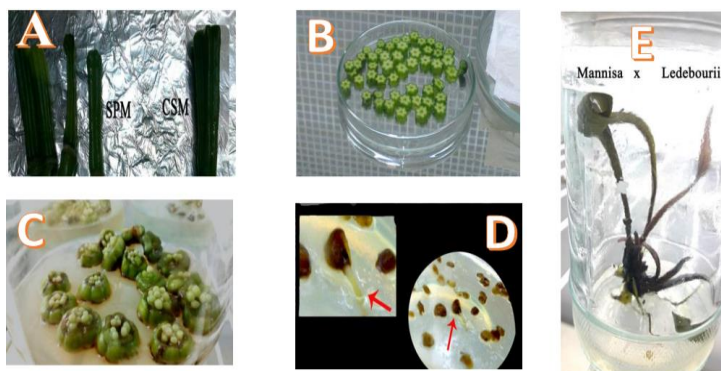
جدول ۱. تجزیه واریانس اثر زمان برداشت و ترکیب تلاقی‌های مختلف در آزمایش گرده‌افشانی خامه قطع‌شده بر صفات مورد بررسی در تلاقی بین ارقام آسیایی و اورینتال به‌عنوان والد مادری و گونه *Lilium ledebourii* به‌عنوان والد گرده‌دهنده

Table 1. Analysis of variance for effect of harvest time and different crosses in Cut Style pollination experiment on evaluated traits between interspecific crossing in Asiatic and Oriental cultivars as maternal and *Lilium ledebourii* as pollen donor plant

Source of variance	df	Mean squares					
		Number of produced ovules	Capsule weight	Ovule weight	Number of produced capsule in CSM	Ovary swallow index	Number of cultured slice
Time	2	4660.95**	0.200 ^{ns}	1.522 ^{ns}	0.148 ^{ns}	0.006 ^{ns}	118.656 ^{ns}
Cultivar	6	22610.3**	22.61**	18.727*	13.712*	24.597**	2253.44**
Time × Cultivar	12	1882.69**	0.115 ^{ns}	3.273 ^{ns}	0.219 ^{ns}	0.005 ^{ns}	37.590 ^{ns}
Error	42	378.88	0.173	3.042	0.512	0.280	93.198
CV %		10.70	20.51	6.81	23.00	33.60	11.64

*, **, ns: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.

*, **, ns: Significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ and non-significant, respectively.



شکل ۲. تولید هیبرید بین‌گونه‌ای مانیسا و سوسن چلچراغ. (A) تولید کیسول پس از گرده‌افشانی کلاله عادی (SPM) و کلاله قطع‌شده (CSM)، (B) کشت قطعات تخمدان، (C) متورم‌شدن تخمک‌ها پس از ۴۰ روز، (D) جوانه‌زنی بذر هیبرید پس از ۱۵۰ روز، (E) تولید گیاهچه درون شیشه‌ای

Figure 2. Interspecific hybrid production between 'Maniasa' and *Lilium ledebourii*. A) capsule production by stigma pollination method, (SPM) and cut style method, (CSM), B) ovary slice culture, C) expanded ovules after 40 days, D) F_1 seed germination after 150 days, E) in vitro production of seedling

مانیسا توانایی تولید هیبرید بین‌گونه‌ای را دارا بوده و تنها در تلاقی بین این رقم و سوسن چلچراغ گیاهچه تولید شد. روش نجات جنین مورد استفاده در این پژوهش، در مورد سایر ارقام موفقیت‌آمیز نبود و جنین‌های به‌دست‌آمده در مراحل مختلف سقط‌شده و از بین رفتند.

نتیجه‌گیری کلی

به‌صورت کلی در این پژوهش جهت عبور از موانع تلاقی بین‌گونه‌ای، از تکنیک گرده‌افشانی خامه قطع‌شده و نجات جنین با موفقیت استفاده شد. در انتهای آزمایش مشخص شد که از بین ارقام مورد استفاده، تنها رقم

REFERENCES

- Bakhshaie, M., Khosravi, S., Azadi, P., Bagheri, H. & van Tuyt, J. M. (2016). Biotechnological advances in *Lilium*. *Plant cell reports*, 35(9), 1799-1826.
- Beal, J. M. (1943). Histological studies on parthenocarpic fruits of *Lilium regale* induced by growth substances. *Botanical Gazette*, 105(1), 25-34.
- De Jong, P.C. (1974). Some notes on the evolution of lilies. *Yearbook North American Lily Society* 27, 23-28.
- Fukai, S., Isobe, T. & Ikoma, C. (2005). LLO hybrid lilies from *L. x formolongiand* chromosome doubled *L. formosanum* var. priceix oriental hybrid 'La Reve'. *Acta Horticulturae*, 673, 377-381.
- Grassotti, A., Nesi, B., Lazzereschi, S., Cacini, S. & Pacifici, S. (2010, August). Breeding Asiatic hybrid lilies: an Italian experience. In: *II International Symposium on the Genus Lilium*, 900, 237-241.
- McRae, E. A. (1998). *Lilies: A Guide for Growers and Collectors*. Timber Press. Portland, Oregon. pp 239-257.

7. Mirmasoumi, M., Azadi, P., Sharafi, A., Ntui Otang, V. & Mii, M. (2013). Simple protocol for plant regeneration of *Lilium ledebourii* using transverse thin cell layer. *Progress in Biological Sciences*, 3(2), 117-122.
8. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
9. Okazaki, K., Asano, Y. & Oosawa, K. (1994). Interspecific hybrids between *Lilium* 'Oriental' hybrid and L. 'Asiatic' hybrid produced by embryo culture with revised media. *Breeding Science*, 44, 59-64.
10. Pomares-Viciana, T., Die, J., Del Río-Celestino, M., Román, B. & Gómez, P. (2017). Auxin signalling regulation during induced and parthenocarpic fruit set in zucchini. *Molecular Breeding*, 37(4), 56.
11. Prosevičius, J. & Strikulyte, L. (2004). Interspecific hybridization and embryo rescue in breeding of lilies. *Acta Universitatis Latviensis*, 676, 213-676.
12. Shivanna, K. R. & Tandon, R. (2014). *Reproductive Ecology of Flowering Plants: A manual* (170 p.). *New Delhi, India: Springer*.
13. Van Tuyl, J. M., Chung, M. Y., Chung, J. D. & Lim, K. B. (2002). Introgression studies using GISH in interspecific *Lilium* hybrids of *L. longiflorum* x Asiatic, *L. longiflorum* x *L. rubellum* and *L. auratum* x *L. henryi*. *The Lily Yearbook of the North American Lily Society*, 55, 17-22.
14. Van Tuyl, J. M. & De Jeu, M. J. (1997) Methods for overcoming interspecific crossing barriers. In: Shivanna, K-R., Sawhney, V-K. (eds), *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. Cambridge University Press, pp 273-293.
15. Van Tuyl, J. M., Maas, I. W. & Lim, K. B. (2000). Introgression in interspecific hybrids of lily. In: *VIII International Symposium on Flowerbulbs*, 570, 213-218.
16. Van Tuyl, J. M., Van Diën, M. P., Van Creij, M. G. M., Van Kleinwee, T. C. M., Franken, J. & Bino, R. J. (1991). Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Science*, 74, 115-126.
17. Willemse, M. T. M., Plyushch, T. A. & Reinders, M. C. (1995). In vitro micropylar penetration of the pollen tube in the ovule of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval and *Lilium longiflorum* Thunb.: Conditions, attraction and application. *Plant Science*, 108(2), 201-208.
18. Woodcock, H. B. D. & Stearn, W. T. (1950). *Lilies of the world. Their Cultivation & Classification*. *Country Life Limited. London*. pp 15-22.
19. Zhang, X., Ren, G., Li, K., Zhou, G. & Zhou, S. (2012). Genomic variation of new cultivars selected from distant hybridization in *Lilium*. *Plant Breeding*, 131(1), 227-230.
20. Zhou, S., Ramanna, M. S., Visser, R. G. & van Tuyl, J. M. (2008). Genome composition of triploid lily cultivars derived from sexual polyploidization of Longiflorum x Asiatic hybrids (*Lilium*). *Euphytica*, 160(2), 207-215.
21. Zhou, S., Yuan, G., Xu, P. & Gong, H. (2014). Study on lily introgression breeding using allotriploids as maternal parents in interploidy hybridizations. *Breeding Science*, 64(1), 97-102.